

# Optimización y puesta a punto de métodos para la determinación de plaguicidas organoclorados mediante técnicas cromatográficas. Automatización de métodos.



Máster en Ingeniería Química

## Trabajo Fin de Máster

Autor:

Antonio Segura Morilla

Tutor/es:

Nuria Boluda Botella

Julio Llorca Pórcel



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

Septiembre 2017

## **CERTIFICADO**

Dña. Nuria Boluda Botella, profesora del departamento de Ingeniería Química, certifica que el presente Trabajo Fin de Máster titulado “Optimización y puesta a punto de métodos para la determinación de plaguicidas organoclorados mediante técnicas cromatográficas. Automatización de métodos” ha sido realizado en la empresa “LABAQUA S.A.” bajo la supervisión de D. Julio Llorca Pórcel, jefe del departamento de cromatografía, y que reúne las condiciones de calidad y rigor científico para que pueda ser presentado y defendido ante la comisión correspondiente.

27 de septiembre de 2017

Firma:

“La Tierra no es una herencia de nuestros padres,  
sino un préstamo de nuestros hijos.”

## **AGRADECIMIENTOS**

Principalmente quisiera agradecer a mis tutores Dña. Nuria Boluda Botella, profesora del departamento de Ingeniería Química, y a D. Julio Llorca Pórcel, jefe del departamento de cromatografía de LABAQUA S.A., por haberme ayudado en todo lo posible y haberme transmitido sus conocimientos mostrándome siempre su gran apoyo.

En segundo lugar, deseo agradecer a aquellos miembros del departamento de cromatografía toda su dedicación y ayuda que directa o indirectamente me han mostrado. Habéis conseguido que me sintiera uno más del departamento.

Quería hacer una mención especial a mi compañero de análisis Jose Salavert Martínez, aunque no aparezcas como tutor me has enseñado todo lo que has podido y me has llevado de la mano como si fuéramos hermanos, sin tu ayuda este proyecto no hubiera sido posible.



Y, por último, quisiera agradecer a mi familia, amigos y pareja, por estar siempre a mi lado, creer en mí y nunca dejar de apoyarme en todos mis proyectos y etapas de mi vida.

**Resumen:**

Debido a la problemática del uso de plaguicidas organoclorados y su repercusión en las aguas naturales y a la creciente presión legislativa en materia de contaminantes prioritarios y/o emergentes, se pone de manifiesto la necesidad de implantar nuevas técnicas analíticas que permitan un mejor análisis de dichas sustancias. En el presente proyecto se realiza la validación de un nuevo método analítico que se basa en la tecnología  $\mu$ Drop. Esta nueva técnica que emplea como agente extractante el bálsamo  $\mu$ Drop (microextracción) permite realizar los análisis más rápidamente y emplear un menor volumen que técnicas convencionales de extracción líquido-líquido. Esta técnica se aplica con un cromatógrafo de gases con detección mediante un espectrómetro de masas con triple cuadrupolo. La validación, que pretende comprobar la robustez del método, se evalúa en la matriz más desfavorable (agua residual) y evalúa la sensibilidad, repetibilidad, reproducibilidad, exactitud e incertidumbre. La sensibilidad alcanzada es más que suficiente para cumplir la legislación vigente; el resto de parámetros cumplieron satisfactoriamente con los límites impuestos por el procedimiento interno de LABAQUA siendo: incertidumbre  $< 40\%$  para un margen de seguridad  $k=2$ , repetibilidad y reproducibilidad  $< 20\%$ , exactitud  $< 2\%$ .



**Abstract:**

Due to the problem of the use of organochlorine pesticides and their impact on natural waters and the increasing legislative pressure on priority and / or emerging pollutants, it shows the need to implement new analytical techniques to allow a better analysis of these substances. In the present project, the validation of a new analytical method based on  $\mu$ Drop technology has carried out. This new technique that uses as extractant the  $\mu$ Drop balm (microextraction) allows to perform the analyzes more quickly and to use a smaller volume than conventional techniques of extraction liquid-liquid. This technique is applied with a gas chromatograph with detection by triple quadrupole mass spectrometer. The validation tries to verify the robustness of the method, is evaluated in the most unfavorable matrix (residual water) and evaluates the sensitivity, repeatability, reproducibility, accuracy and uncertainty. The sensitivity achieved is more than sufficient to comply with current legislation; the remaining parameters satisfactorily complied with the limits imposed by LABAQUA's internal procedure: uncertainty  $< 40\%$  for a margin of safety  $k = 2$ , repeatability and reproducibility  $< 20\%$ , accuracy  $< 2\%$ .



 Universitat d'Alacant Universidad de Alicante	<i>Optimización y puesta a punto de métodos para la determinación de plaguicidas organoclorados mediante técnicas cromatográficas. Automatización de métodos.</i>	 LABAQUA
	<i>Trabajo Fin de Máster – Máster en Ingeniería Química</i>	

## Índice

Glosario de términos y acrónimos .....	1
1. Introducción .....	2
1.1. Antecedentes .....	2
1.1.1. Problemática general de la contaminación de las aguas .....	2
1.1.2. Normativa europea sobre contaminantes orgánicos en aguas. Contaminantes orgánicos prioritarios .....	4
1.1.3. Contaminantes orgánicos emergentes .....	9
1.2. Problemática del uso de plaguicidas organoclorados.....	11
1.2.1. Plaguicidas organoclorados y el medioambiente.....	13
1.2.2. Plaguicidas organoclorados y la salud pública .....	15
1.3. Diagnóstico del problema .....	17
1.3.1. Validación del método .....	17
1.4. Compuestos orgánicos semivolátiles a determinar .....	18
1.4.1. Aromáticos clorados.....	18
1.4.2. Cicloalcanos clorados .....	19
1.4.3. Ciclodiénicos clorados .....	20
1.5. Cromatografía de gases con detección mediante un espectrómetro de masas con triple cuádrupolo. ....	21
2. Objeto y alcance del proyecto.....	25
3. Procedimiento para la determinación de plaguicidas organoclorados contaminantes .....	26
4. Optimización del método de extracción .....	29
4.1. Tipo de disolvente .....	29
4.2. Tiempo de extracción.....	32
4.3. Relación de volúmenes .....	33
5. Optimización del método cromatográfico .....	34
5.1. Temperatura del inyector .....	34
6. Validación .....	36
6.1. Límites de cuantificación.....	36
6.2. Repetibilidad .....	37
6.3. Reproducibilidad .....	37

 Universitat d'Alacant Universidad de Alicante	<p><i>Optimización y puesta a punto de métodos para la determinación de plaguicidas organoclorados mediante técnicas cromatográficas. Automatización de métodos.</i></p> <p><i>Trabajo Fin de Máster – Máster en Ingeniería Química</i></p>	 LABAQUA
---	---	--



6.4. Incertidumbre .....	38
6.5. Exactitud.....	38
7. Resultados .....	39
7.1. Repetibilidad .....	39
7.2. Reproducibilidad .....	41
7.3. Incertidumbre .....	43
7.4. Exactitud.....	45
8. Conclusiones.....	47
Bibliografía .....	48

 Universitat d'Alacant Universidad de Alicante	<i>Optimización y puesta a punto de métodos para la determinación de plaguicidas organoclorados mediante técnicas cromatográficas. Automatización de métodos.</i>	
	<i>Trabajo Fin de Máster – Máster en Ingeniería Química</i>	

## Glosario de términos y acrónimos

EDAR	Estación Depuradora de Aguas Residuales
DMA	Directiva Marco del Agua
UE	Unión Europea
PAHs	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
PBDEs	Polibromodifenil éteres
MA	Media anual
CMA	Concentración máxima admisible [ $\mu\text{g/l}$ ]
OMS	Organización Mundial de la Salud
GC	Cromatografía de gases
MS	Espectrometría de masas
TQ	Triple cuadrupolo
DCM	Diclorometano
HEX	Hexano
V	Volumen
PI	Patrón interno
S	Desviación estándar muestral
r	Repetibilidad
R	Reproducibilidad
I	Incertidumbre
Vt	Valor teórico
$\bar{x}$	Valor medio
$C_f$	Concentración teórica
$dC_f^d$	Error de preparación
u	Incertidumbre de preparación
E	Exactitud



 Universitat d'Alacant Universidad de Alicante	<i>Optimización y puesta a punto de métodos para la determinación de plaguicidas organoclorados mediante técnicas cromatográficas. Automatización de métodos.</i> Trabajo Fin de Máster – Máster en Ingeniería Química	 LABAQUA
---	---	--

## 1. Introducción

### 1.1. Antecedentes

#### 1.1.1. Problemática general de la contaminación de las aguas

El volumen total de agua en la hidrosfera es de aproximadamente 1.400 millones de km<sup>3</sup>. Sin embargo solo el 2,5%, o alrededor de 35 millones de km<sup>3</sup>, corresponde a agua dulce cuya mayor parte se presenta en estado de agregación sólido, ubicado en la región de la Antártida y en Groenlandia, o en acuíferos de aguas subterráneas. Las principales fuentes de agua para uso humano provienen de lagos y ríos y de cuencas de aguas subterráneas poco profundas siendo de sólo 200.000 km<sup>3</sup>, es decir menos del 1% del total de agua dulce y sólo el 0,01% de toda el agua del planeta [1].

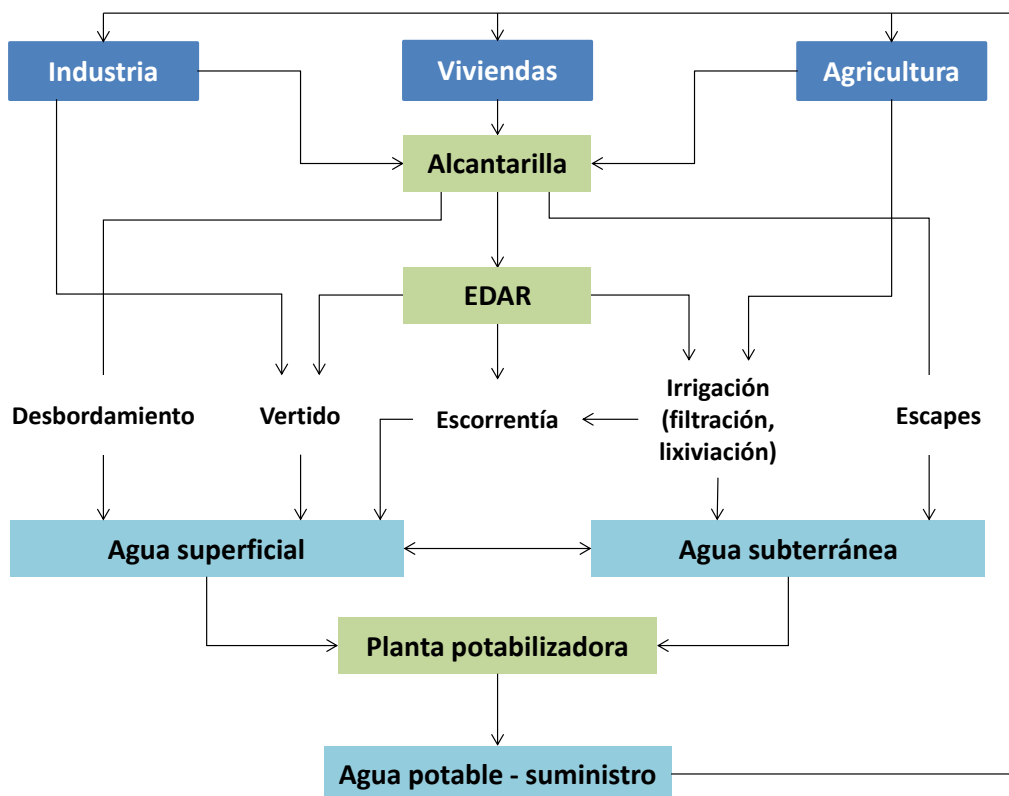
Debido al aumento en la demanda de agua a causa del crecimiento demográfico, el desarrollo industrial y la expansión del cultivo de regadío, y a que gran parte de esa agua disponible está ubicada lejos de las poblaciones humanas hace que la gestión de la misma sea un factor crítico. Todo esto llevó a la aparición de reglamentos y planificaciones para gestionar y aprovechar el agua disponible teniendo en cuenta la demanda futura de la misma [2].

Considerando todo esto es un hecho preocupante que las fuentes de agua destinadas al uso humano estén contaminadas con xenobióticos, introducidos en su mayoría en el medio ambiente durante el último siglo. Se conocen alrededor de 126 millones de sustancias orgánicas e inorgánicas, con un registro de 15.000 sustancias nuevas al año [3], de las cuales miles son empleadas en los hogares, la industria y la agricultura. Estos productos químicos fueron empleados sin tener en cuenta su repercusión medioambiental y sobre la salud humana. Los principales ríos y cuencas subterráneas del planeta se encuentran gravemente agotados o contaminados [2] lo que conlleva la degradación y contaminación de ecosistemas amenazando la salud y el sustento de las personas que dependen de ellos.

Los contaminantes se incorporan al medio ambiente por diferentes vías, tanto directas, a través de descargas a las aguas superficiales, como indirectas mediante filtraciones, empleo de abonos etc. En la **figura 1.1.1.1.** se muestran posibles rutas de entrada de contaminantes al medio ambiente a través del denominado ciclo del agua.



Centrándose en la problemática del agua en España, es de destacar que, es el país europeo con mayor escasez de agua y con mayor estrés hídrico [5]. Una de las posibles medidas para paliar los efectos de esta escasez, es la reutilización del agua ya que es una alternativa medioambientalmente ventajosa frente a otros métodos que conllevan un mayor consumo energético e impacto medioambiental negativo.

Las EDARs reciben aguas residuales de muy diferente composición, existiendo grandes diferencias en los componentes minoritarios de las mismas, entre los que se encuentran compuestos orgánicos prioritarios y emergentes, así como plaguicidas de diverso tipo.



**Figura 1.1.1.1.** Posibles vías de incorporación de contaminantes al ciclo del agua (adaptación propia [4])

Estas sustancias se encuentran en bajas concentraciones en los distintos compartimentos medioambientales acuáticos y por tanto es de gran interés el desarrollo de metodologías analíticas capaces de detectar e identificar estos contaminantes orgánicos y en particular aquellos clasificados como prioritarios según se define en la Directiva 2000/60/CE o Directiva Marco del Agua (DMA). Además, es de gran interés actual la detección de contaminantes emergentes, o aquellas sustancias potencialmente peligrosas, y cuyo vertido no está regulado y se realiza de forma continuada en el medio ambiente. , a través de EDARs principalmente.

 <p>Universitat d'Alacant Universidad de Alicante</p>	<p><i>Optimización y puesta a punto de métodos para la determinación de plaguicidas organoclorados mediante técnicas cromatográficas. Automatización de métodos.</i></p> <p><i>Trabajo Fin de Máster – Máster en Ingeniería Química</i></p>	 <p>LABAQUA</p>
--	---	--

### 1.1.2. Normativa europea sobre contaminantes orgánicos en aguas. Contaminantes orgánicos prioritarios



El agua se ha considerado siempre como un recurso natural que debe preservarse de una mala utilización o privatización. Ya en el año 1879 se establece la “Ley de aguas”, derogada posteriormente por la entrada en vigor de la Ley 29/1985, de 2 de agosto, de aguas [6], donde se pone de manifiesto que *el agua es un recurso natural escaso, indispensable para la vida y para el ejercicio de la inmensa mayoría de las actividades económicas; es irremplazable, no ampliable por la mera voluntad del hombre, irregular en su forma de presentarse en el tiempo y en el espacio, fácilmente vulnerable y susceptible de usos sucesivos.*

Desde la publicación de la Ley de Aguas, de 2 de agosto de 1985 hasta la incorporación de España a la Unión Europea (UE) en igualdad de derechos y deberes que el resto de países miembros, ha habido muchas medidas legislativas que, con distinto rango normativo (nacional o autonómico), ámbito de aplicación (aguas subterráneas, aguas de consumo humano etc.) y aspectos a regular (frecuencia de muestreo, normas de calidad etc.); se han ido adaptando progresivamente para proteger los recursos hídricos existentes.

El 23 de octubre de 2000 se aprobó la Directiva 2000/60/CE (DMA) del departamento europeo y del consejo por la que se establecía un marco comunitario en el ámbito de la política de aguas [7]. Por medio de esta directiva se establece un marco para la *protección de las aguas superficiales continentales, de transición, costeras, y subterráneas que:*

- *prevenga todo deterioro adicional y proteja y mejore el estado de los ecosistemas acuáticos;*
- *promueva un uso sostenible del agua basado en la protección a largo plazo de los recursos hídricos disponibles;*
- *tenga por objeto una mayor protección y mejora del medio acuático, entre otras formas mediante medidas específicas de reducción progresiva de los vertidos, las emisiones y las pérdidas de sustancias prioritarias;*
- *garantice la reducción progresiva de la contaminación del agua subterránea y evite nuevas contaminaciones; y*
- *contribuya a paliar los efectos de las inundaciones y sequías,*

Así, inmediatamente y durante los años siguientes tras la entrada en vigor de la Directiva Marco del Agua (DMA) se estableció la primera lista de 33 sustancias o grupos de sustancias prioritarias mediante la Decisión número 2455/2001/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 20 de Noviembre de 2001 [8] cuya contaminación debe ser reducida o eliminada, incluyéndose en el anexo X de la DMA.

 Universitat d'Alacant Universidad de Alicante	<i>Optimización y puesta a punto de métodos para la determinación de plaguicidas organoclorados mediante técnicas cromatográficas. Automatización de métodos.</i> <i>Trabajo Fin de Máster – Máster en Ingeniería Química</i>	 LABAQUA
---	--	--

El 16 de diciembre de 2008 se aprobó la Directiva 2008/105/CE del parlamento europeo y del consejo [9] relativa a las normas de calidad ambiental en el ámbito de la política de aguas, por la que se modifica la Directiva 2000/60/CE citada con anterioridad. En la Directiva 2008/105/CE se incluye el parámetro (NCA-MA) que es la norma de calidad ambiental expresada como valor medio anual, y se delimita la concentración máxima admisible (CMA) de las sustancias prioritarias, estableciendo así normas de calidad ambiental.

Años después la lista de sustancias prioritarias contempladas en el anexo X de la DMA fue objeto de revisión, tras la cual se observó la necesidad de su modificación debido a la identificación de nuevas sustancias de carácter prioritario y debido a la revisión de las (NCA) para algunas sustancias existentes. Como consecuencia el 12 de agosto de 2013 se aprobó la Directiva 2013/39/UE del parlamento europeo y del consejo [10] por la que se modifican las Directivas 2000/60/CE y 2008/105/CE en cuanto a las sustancias prioritarias en el ámbito de la política de aguas, incluyendo una nueva lista de 45 sustancias prioritarias con sus respectivas normas de calidad ambiental y límites. También se incluyó una lista de observación de sustancias para recabar datos de seguimiento a nivel comunitario que sirvan de base para futuros ejercicios de asignación de prioridad.

La citada lista de sustancias prioritarias se traspone a España mediante el Real Decreto 817/2015, de 11 de septiembre, por el que se establecen los criterios de seguimiento y evaluación del estado de las aguas superficiales y las normas de calidad ambiental

Las sustancias prioritarias de una forma u otra son nocivas para la salud de los seres humanos y para el medio ambiente. Como se observa en la **tabla 1.1.2.1.** incluidas en las sustancias prioritarias se encuentran metales pesados, hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), compuestos orgánicos como los plaguicidas o pesticidas, difeniléteres bromados (PBDEs) etc.

**Tabla 1.1.2.1.** Lista de sustancias prioritarias según la Directiva 2013/39/UE del parlamento europeo y del consejo de 12 de agosto de 2013 y sus normas de calidad ambiental (NCA).

Nº	Nombre de la sustancia	MA-NCA aguas superficiales continentales	MA-NCA otras aguas superficiales	CMA-NCA aguas superficiales continentales	CMA-NCA otras aguas superficiales
(1)	Alacloro	0,3	0,3	0,7	0,7
(2)	Antraceno	0,1	0,1	0,1	0,1
(3)	Atrazina	0,6	0,6	2,0	2,0
(4)	Benceno	10	8	50	50
(5)	Difeniléteres bromados			0,14	0,14
(6)	Cadmio y sus compuestos	$\leq 0,08$ (Clase 1) 0,08 (Clase 2) 0,09 (Clase 3) 0,15 (Clase 4) 0,25 (Clase 5)	0,2	$\leq 0,45$ (Clase 1) 0,45 (Clase 2) 0,6 (Clase 3) 0,9 (Clase 4) 1,5 (Clase 5)	$\leq 0,45$ (Clase 1) 0,45 (Clase 2) 0,6 (Clase 3) 0,9 (Clase 4) 1,5 (Clase 5)
(6a)	Tetracloruro de carbono	12	12	No aplicable	No aplicable
(7)	Cloroalcanos C <sub>10-13</sub>	0,4	0,4	1,4	1,4
(8)	Clorofenvinfos	0,1	0,1	0,3	0,3
(9)	Clorpirifos (clorpirifós-eti-lo)	0,03	0,03	0,1	0,1
(9a)	Plaguicidas de tipo ciclodieno: Aldrina Dieldrina Endrina Isodrina	$\Sigma = 0,01$	$\Sigma = 0,005$	No aplicable	No aplicable
(9b)	DDT total	0,025	0,025	No aplicable	No aplicable
	p,p' DDT	0,01	0,01	No aplicable	No aplicable
(10)	1,2-dicloroetano	10	10	No aplicable	No aplicable
(11)	Diclorometano	20	20	No aplicable	No aplicable
(12)	Di(2-etilhexil)ftalato (DEHP)	1,3	1,3	No aplicable	No aplicable
(13)	Diurón	0,2	0,2	1,8	1,8



Nº	Nombre de la sustancia	MA-NCA aguas superficiales continentales	MA-NCA otras aguas superficiales	CMA-NCA aguas superficiales continentales	CMA-NCA otras aguas superficiales
(14)	Endosulfán (alfa-endosulfan)	0,005	0,0005	0,01	0,004
(15)	Fluoranteno	0,0063	0,0063	0,12	0,12
(16)	Hexaclorobenceno			0,05	0,05
(17)	Hexaclorobutadieno			0,6	0,6
(18)	Hexaclorociclohexano (lindano)	0,02	0,002	0,04	0,02
(19)	Isoproturón	0,3	0,3	1,0	1,0
(20)	Plomo y sus compuestos	1,2	1,3	14	14
(21)	Mercurio y sus compuestos			0,07	0,07
(22)	Naftaleno	2	2	130	130
(23)	Níquel y sus compuestos	4	8,6	34	34
(24)	Nonilfenoles (4-(para)-nonilfenol)	0,3	0,3	2,0	2,0
(25)	Octilfenoles (para-ter-octilfenol)	0,1	0,01	No aplicable	No aplicable
(26)	Pentaclorobenceno	0,007	0,0007	No aplicable	No aplicable
(27)	Pentaclorofenol	0,4	0,4	1	1
(28)	Hidrocarburos aromáticos policíclicos	No aplicable	No aplicable	No aplicable	No aplicable
	Benzo[a]pireno	$1,7 \cdot 10^{-4}$	$1,7 \cdot 10^{-4}$	0,27	0,027
	Benzo[b]fluoranteno	Véase nota 1	Véase nota 1	0,017	0,017
	Benzo[g,h,i]perileno	Véase nota 1	Véase nota 1	$8,2 \cdot 10^{-3}$	$8,2 \cdot 10^{-4}$
	Benzo[k]fluoroanteno	Véase nota 1	Véase nota 1	0,017	0,017
	Indeno[1,2,3-cd]pireno	Véase nota 1	Véase nota 1	No aplicable	No aplicable
(29)	Simazina	1	1	4	4
(29a)	Tetracloroetileno	10	10	No aplicable	No aplicable

Nº	Nombre de la sustancia	MA-NCA aguas superficiales continentales	MA-NCA otras aguas superficiales	CMA-NCA aguas superficiales continentales	CMA-NCA otras aguas superficiales
(29b)	Tricloroetileno	10	10	No aplicable	No aplicable
(30)	Compuestos del tributilestano (catión)	0,0002	0,0002	0,0015	0,0015
(31)	Triclorobencenos (1,2,4-triclorobenceno)	0,4	0,4	No aplicable	No aplicable
(32)	Triclorometano	2,5	2,5	No aplicable	No aplicable
(33)	Trifluralina	0,03	0,03	No aplicable	No aplicable
(34)	Dicofol	$1,3 \cdot 10^{-3}$	$3,2 \cdot 10^{-5}$	No aplicable	No aplicable
(35)	Ácido perfluorooctanosulfónico y sus derivados (PFOS)	$6,5 \cdot 10^{-4}$	$1,3 \cdot 10^{-4}$	36	7,2
(36)	Quinoxifeno	0,15	0,015	2,7	0,54
(37)	Dioxinas y compuestos similares			No aplicable	No aplicable
(38)	Aclonifeno	0,12	0,012	0,12	0,012
(39)	Bifenox	0,012	0,0012	0,04	0,004
(40)	Cibutrina	0,0025	0,0025	0,016	0,016
(41)	Cipermetrina	$8 \cdot 10^{-5}$	$8 \cdot 10^{-6}$	$6 \cdot 10^{-4}$	$6 \cdot 10^{-5}$
(42)	Diclorvós	$6 \cdot 10^{-5}$	$6 \cdot 10^{-5}$	$7 \cdot 10^{-5}$	$7 \cdot 10^{-5}$
(43)	Hexabromociclododecano (HBCDD)	0,0016	0,0008	0,5	0,05
(44)	Heptacloro y epóxido de heptacloro	$2 \cdot 10^{-7}$	$1 \cdot 10^{-8}$	$3 \cdot 10^{-4}$	$3 \cdot 10^{-5}$
(45)	Terbutrina	0,065	0,0065	0,34	0,034

MA: media anual. CMA: concentración máxima admisible. Unidades: [µg/l]

Nota 1: Por lo que respecta al grupo de sustancias prioritarias de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) (nº 28), las NCA de la biota y las correspondientes NCA-MA en el agua se refieren a la concentración de benzo[a]pireno, en cuya toxicidad se basan. El benzo[a]pireno puede considerarse como un marcador de los otros HAP, ya que solo tal sustancia debe ser objeto de seguimiento a efectos de comparación con las NCA de la biota o las correspondientes NCA-MA en el agua.



 Universitat d'Alacant Universidad de Alicante	<i>Optimización y puesta a punto de métodos para la determinación de plaguicidas organoclorados mediante técnicas cromatográficas. Automatización de métodos.</i> Trabajo Fin de Máster – Máster en Ingeniería Química	 LABAQUA
---	---	--

### 1.1.3. Contaminantes orgánicos emergentes



Durante las últimas décadas, se han centrado los esfuerzos en el estudio de los contaminantes químicos cuya presencia en el medio ambiente ha estado o está regulada en las distintas legislaciones y en su mayoría son sustancias apolares, bioacumulables, persistentes y tóxicas. Sin embargo, gracias al desarrollo de nuevos y más sensibles métodos de análisis se ha podido alertar de la presencia de otros contaminantes, potencialmente peligrosos, denominados globalmente como contaminantes emergentes.

El término de contaminantes emergentes hace referencia a compuestos de distinto origen y naturaleza química, cuya presencia en el medio ambiente no se considera significativa en términos de distribución y/o concentración, por lo que pasan inadvertidos; no obstante, en la actualidad están siendo ampliamente detectados y tienen el potencial de ocasionar un impacto ecológico, así como efectos adversos sobre la salud humana [11]. Estos compuestos entran en el medio ambiente a través de vías, tales como aguas residuales de tipo doméstico e industrial [12], de los residuos de las plantas de tratamiento [13] y de las actividades agrícolas y ganaderas [14], y tienen la particularidad de que debido a su elevada producción y consumo, se introducen continuamente en el ambiente compensando sus tasas de transformación y eliminación.

Los contaminantes emergentes comprenden una amplia gama de compuestos químicos, productos farmacéuticos, plaguicidas o pesticidas, plastificantes, productos de cuidado personal y aditivos industriales, que no están incluidos en el monitoreo actual de programas de tratamiento de aguas. En la **tabla 1.1.3.1.** se puede observar una lista de los principales contaminantes emergentes en aguas.

En los últimos años ha crecido la preocupación en torno a los plaguicidas, debido a sus metabolitos. Recientemente se ha constatado que los metabolitos, productos de degradación, de los plaguicidas pueden ser más tóxicos que los compuestos a partir de los cuales se generan [15]. Los estudios han demostrado que los metabolitos de plaguicidas a menudo se detectan en aguas subterráneas en concentraciones más altas en comparación con los compuestos precursores [16].



 Universitat d'Alacant Universidad de Alicante	<i>Optimización y puesta a punto de métodos para la determinación de plaguicidas organoclorados mediante técnicas cromatográficas. Automatización de métodos.</i> <i>Trabajo Fin de Máster – Máster en Ingeniería Química</i>	 LABAQUA
---	--	--

**Tabla 1.1.3.1.** . Lista de los principales productos considerados contaminantes emergentes [17]

Productos investigados como contaminantes emergentes	
Plaguicidas o pesticidas y sus productos de degradación/transformación	Eldrín, DDT, Aldrín etc.
Productos analgésicos	Ibuprofeno, acetaminofén etc.
Productos antihipertensivos	Metoprolol, propanolol etc.
Productos antibióticos	Tetraciclinas, amiglicósidos etc.
Drogas ilícitas	Anfetamina, cocaína etc.
Hormonas esteroides	Estriol, androstenoide etc.
Compuestos “Estilo de vida”	Nicotina, cafeína, teobromina, teofilia etc.
Retardantes de llama/fuego	Polibromedifenil (PBDEs), tris(cloro isopropil)fosfato (TCPP), hexabromociclododecano (HBCD) etc.
Surfactantes	Detergentes, agentes adherentes, dispersantes, solubilizantes y emulsificantes
Productos para tratamientos de agua	Residuos de desinfectantes y sus subproductos (DSP)
Aditivos industriales y subproductos	Disolventes clorados, hidrocarburos del petróleo, plastificantes, ftalatos, adipatos etc.
Aditivos alimenticios	Citrato de trietilo, hidroxianisobutilado (BHA), triacetina, terpineolsucralosa, sacarina etc.
Cuidado personal	Fragancias, perfumas y macrocíclicos; protección solar, Benzofenona; repelentes de insectos: N,N-Dietiltoluamida, parabenos; jabón, triclosan

## 1.2. Problemática del uso de plaguicidas organoclorados



El Código Internacional de Conducta Sobre la Distribución y Uso de Plaguicidas de las Naciones Unidas [18] establece que un plaguicida es cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, incluyendo los vectores de enfermedades humanas o de los animales, las especies de plantas o animales indeseables que causan perjuicio o que interfieren de cualquier otra forma en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, productos agrícolas, madera y productos de madera o alimentos para animales, o que pueden administrarse a los animales para combatir insectos, arácnidos u otras plagas en o sobre sus cuerpos. El término incluye las sustancias destinadas a utilizarse como reguladoras del crecimiento de las plantas, defoliantes, desecantes, agentes para reducir la densidad de fruta o agentes para evitar la caída prematura de la fruta, y las sustancias aplicadas a los cultivos antes o después de la cosecha para proteger el producto contra la deterioración durante el almacenamiento y transporte.

Los plaguicidas pueden ser clasificados en función de algunas de sus características principales, como puede ser la toxicidad aguda o la vida media. La Organización Mundial de la Salud (OMS) establece una clasificación basada en su peligrosidad o grado de toxicidad aguda, definida ésta como la capacidad del plaguicida de producir un daño agudo a la salud a través de una o múltiples exposiciones, en un período de tiempo relativamente corto (**tabla 1.2.1.**). La toxicidad se mide mediante la dosis letal media ( $DL_{50}$ \*) la cual varía en función del estado del producto [19].

**Tabla 1.2.1.** Clasificación toxicológica de plaguicidas según la OMS.

Clasificación Toxicológica de los Plaguicidas					
Clasificación de la OMS según los riesgos	Formulación líquida $DL_{50}$ aguda		Formulación sólida $DL_{50}$ aguda		Ejemplos
	Oral	Dermal	Oral	Dermal	
Clase I a sumamente peligrosos	>20	>40	>5	>10	Dieldrín
Clase I b muy peligrosos	20 a 200	40 a 400	5 a 50	10 a 100	Eldrín
Clase II moderadamente peligrosos	200 a 2000	400 a 4000	50 a 500	10 a 1000	DDT
Clase III poco peligrosos	2000 a 3000	> a 4000	500 a 2000	> a 1000	Malatión
Clase IV normalmente no ofrecen peligro	> a 3000		> a 2000		Glisofato

\* $DL_{50}$  es la estimación estadística de la cantidad de una sustancia tóxica (mg/kg) por peso corporal, necesaria para matar al 50% de animales de experimentación (usualmente ratas de laboratorio) en los que se ensaya el efecto letal de la sustancia, administrándola por vía oral o dérmica, durante un período de

 Universitat d'Alacant Universidad de Alicante	<i>Optimización y puesta a punto de métodos para la determinación de plaguicidas organoclorados mediante técnicas cromatográficas. Automatización de métodos.</i> Trabajo Fin de Máster – Máster en Ingeniería Química	 LABAQUA
---	---	--

tiempo determinado y seguimiento en un período postexposición. Cuando la exposición a la sustancia tóxica es a través del aire o el agua se le llama  $CL_{50}$  y se expresa en mg/L.

Por su vida media, los plaguicidas se pueden clasificar como permanentes, persistentes, moderadamente persistentes y no persistentes (**tabla 1.2.2.**).

**Tabla 1.2.2.** Clasificación de los plaguicidas según su vida media de efectividad [20]

Persistencia <sup>1</sup>	Vida media <sup>2</sup>	Ejemplos
No persistente	De días hasta 12 semanas	Malatión, diazinón, carbarilo, diametrín
Moderadamente persistente	De 1 a 18 meses	Paratión, lannate
Persistente	De varios meses a 20 años	DDT, aldrín, dieldrín
Permanentes	Indefinidamente	Productos hechos a partir de mercurio, plomo, arsénico



<sup>1</sup>Capacidad de una sustancia o un compuesto, de permanecer en un sustrato del ambiente en particular, después de que ha cumplido el objetivo por el cual se aplicó.

<sup>2</sup>Lapso de tiempo necesario para que se degrade la mitad del compuesto o mezcla aplicada

El uso de productos químicos para la eliminación y prevención de plagas se remonta a los años del imperio romano donde ya se recomendaba el empleo de arsénico como insecticida. En el siglo XIX se utilizaba el pelitre y el jabón para combatir las plagas de insectos, así como lavatorios elaborados a partir de una mezcla de tabaco, azufre y cal. A mediados del siglo XX comenzó el desarrollo de plaguicidas más potentes, entre ellos los compuestos organoclorados. Uno de los primeros y el más conocido, fue el DDT (dicloro difenil tricloroetano), que fue empleado por Suiza durante la segunda guerra mundial. Durante los siguientes decenios se elaboraron numerosos plaguicidas nuevos, basados en un conocimiento más completo de los mecanismos biológicos y bioquímicos, que a menudo son más eficaces a dosis bajas que los plaguicidas más antiguos [21].

Durante las décadas posteriores a la Segunda Guerra Mundial hubo un uso indiscriminado de compuestos organoclorados, en Norte América el DDT, mientras que en Inglaterra y Japón se empleaban ciclodienicos (*aldrín* y *dielldrín* mayoritariamente) y el hexaclorociclohexano (HCH) [22]. Este uso indiscriminado, el uso actual en países donde no está restringido su empleo y su uso para combatir enfermedades tales como, la malaria y otras enfermedades transmitidas por vectores [23], tienen como consecuencia una introducción elevada de compuestos semivolátiles organoclorados al medio ambiente.

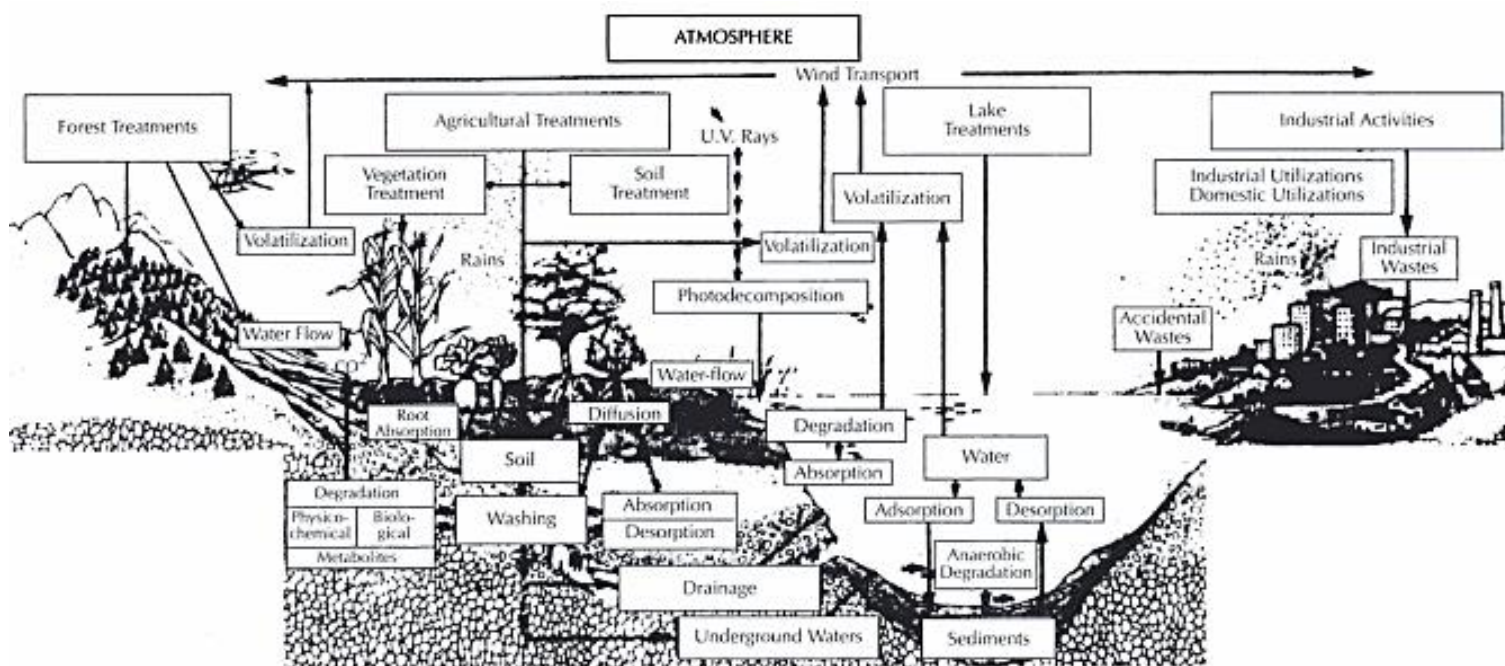
Cabe destacar que, aunque en Europa está prohibido el uso de la mayoría de los plaguicidas organoclorados si se permite a los exportadores vender productos tóxicos obsoletos o prohibidos (en Europa) a otros países respetando el procedimiento de

 <p>Universitat d'Alacant Universidad de Alicante</p>	<p><i>Optimización y puesta a punto de métodos para la determinación de plaguicidas organoclorados mediante técnicas cromatográficas. Automatización de métodos.</i></p> <p><i>Trabajo Fin de Máster – Máster en Ingeniería Química</i></p>	 <p>LABAQUA</p>
--	---	--

“Consentimiento previo al país importador”(PIC) [24]. Además, según análisis del Convenio de Estocolmo sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes hay países con toneladas de plaguicidas organoclorados en stock incluso hasta hace pocos años lo producían, como es el caso de la India que hasta 2009 producía 150 toneladas de DDT anualmente y tenía en stock 49 toneladas de *aldrín*, *dieldrín* y *endrín* (2010), o como Brasil que importaba 69 toneladas de *lindano* (2005).



### 1.2.1. Plaguicidas organoclorados y el medioambiente

Cuando un plaguicida es liberado en el medio ambiente interacciona con los componentes bióticos y abióticos de éste, sufriendo transformaciones en su estructura, capaces de modificar profundamente sus características físico-químicas y su acción biológica. Hay una gran cantidad de rutas que distribuyen los plaguicidas o residuos de plaguicidas por agua (escorrentía, lixiviación), aire (volatilización) y suelo (adsorción) (**figura1.2.1.**).



**Figura 1.2.1.** Dispersión en el medio ambiente de los plaguicidas [25].

Los plaguicidas organoclorados ingresan al medio ambiente acuático de diversas formas ocasionando graves problemas de contaminación, deteriorando la calidad del medio ambiente y provocando efectos nocivos sobre la biota acuática. Las principales fuentes fijas de entrada son el arrastre, lavado y la erosión de suelos, principalmente los agrícolas, que han sido rociados con plaguicidas, y como fuentes puntuales pueden ser

 Universitat d'Alacant Universidad de Alicante	<p><i>Optimización y puesta a punto de métodos para la determinación de plaguicidas organoclorados mediante técnicas cromatográficas. Automatización de métodos.</i></p> <hr/> <p><i>Trabajo Fin de Máster – Máster en Ingeniería Química</i></p>	 LABAQUA
---	---	--

vertidos accidentales de industrias o posibles derrames o pérdidas durante el transporte de plaguicidas como mercancías.

Una vez que los compuestos organoclorados están en el ecosistema acuático pueden ser transportados por advección, dependiendo de la velocidad y dirección de las corrientes, o por dispersión, la cual involucra la mezcla de estas sustancias en la columna de agua donde experimentan reacciones químicas y transformaciones biológicas. Las reacciones de degradación son muy variadas (oxidación, reducción, fotólisis, etc.) y suelen obtenerse una amplia gama de productos de degradación [26]. También se dan transformaciones biológicas por medio de microorganismos, como por ejemplo es el caso del DDT, el cual se transforma en DDD con la ayuda de la *Escherichia coli* [27].



Además de reaccionar en el agua, se produce una paulatina deposición de estos compuestos en los sedimentos donde pueden experimentar hidrólisis, degradación anaerobia o se adsorben en partículas húmicas, minerales o arcillas, constituyendo así una fuente tóxica disponible para los organismos asociados a los sedimentos de los sistemas acuáticos [28].

Al encontrarse plaguicidas organoclorados o productos de degradación de los mismos en el medio acuático es inevitable el contacto con organismos de los ecosistemas acuáticos y todos aquellos que dependan del mismo. Cuando los organismos incorporan estas sustancias no nutritivas a través de la membrana branquial y el tejido epitelial y las almacenan en sus tejidos, se presenta el proceso de bioconcentración, proceso que con el paso del tiempo da lugar a la bioacumulación. Este proceso se encuentra desde el plancton y los peces hasta las aves y mamíferos marinos. Se han encontrado bioacumulación en leones marinos (*Zalophus californianus californianus*) de California [29], en la foca monje (*Monachus monachus*) del mediterráneo [30], etc.

Cuando los compuestos organoclorados se incrementan tanto en los organismos de un nivel trófico inferior, como a niveles tróficos superiores dentro de un ecosistema, se origina la biomagnificación. El oso polar (*Ursus maritimus*) es el mayor carnívoro de la región antártica, encontrándose en el nivel trófico superior, y se ha demostrado un alto grado de biomagnificación de compuestos organoclorados [31] debido a que se alimenta de focas, las cuales a su vez capturan peces y crustáceos con bioconcentración de dichos compuestos [32].

Los compuestos organoclorados tienen un carácter hidrofóbico y tienden a acumularse en el tejido adiposo de los organismos animales. Como todos los organismos contienen lípidos, tanto animales como vegetales, captan fácilmente compuestos organoclorados [33]. Los mamíferos marinos (focas, ballenas, delfines etc.)



 Universitat d'Alacant Universidad de Alicante	<i>Optimización y puesta a punto de métodos para la determinación de plaguicidas organoclorados mediante técnicas cromatográficas. Automatización de métodos.</i> Trabajo Fin de Máster – Máster en Ingeniería Química	 LABAQUA
---	---	--

almacenan una gran cantidad de grasa como aislante térmico y reserva energética, debido a la naturaleza lipofílica de los plaguicidas organoclorados y sus residuos, estos se asocian con los ácidos grasos [30]. Debida a esta naturaleza también se presenta la transferencia de residuos organoclorados durante los periodos de lactancia de madres a hijos, como es el caso de las focas grises (*Halichoerus grypus*) [34].

Algunos plaguicidas especialmente tóxicos pueden afectar gravemente a la biota acuática llegando a ser letales. Los plaguicidas organoclorados provocan trastornos moleculares y fisiológicos en crustáceos, moluscos y peces afectando a su reproducción y crecimiento [35], alterando los procesos de osmoregulación y el consumo de oxígeno [36]. Estas alteraciones implican una disminución de la tasa reproductiva, modificación en la relación depredador-presa y en casos extremos la muerte.

Debido a lo citado con anterioridad se puede concluir que los plaguicidas organoclorados y sus residuos afectan al ecosistema acuático, a todos los niveles tróficos, persistiendo y dañando el equilibrio ecológico.



### 1.2.2. Plaguicidas organoclorados y la salud pública

Sin obviar la importancia de los plaguicidas, tanto en la agricultura [21, 22] como en las actividades de salud pública [23], son innegables los efectos tóxicos que generan en el ser humano.

Existen diversas fuentes de exposición humana a los plaguicidas: las agudas o crónicas, las profesionales o no profesionales y las intencionales o no intencionales. La exposición del hombre a los plaguicidas, que tiene como fin la acumulación de los mismos en el organismo, sucede de tres formas, oral (por ingestión), inhalación (a través de las vías respiratorias) y dérmica (a través de la piel) [37]. Su biodisponibilidad en el organismo depende de su toxicocinética: absorción, distribución, metabolismo y eliminación. Estos procesos están influenciados tanto por factores externos (tipo de empleo, temperatura ambiental, tipo de plaguicida, frecuencia, intensidad y duración de la exposición, etc.) [38], como por factores inherentes al individuo (edad, sexo, dotación genética, estado de salud, estado nutricional, vía principal de absorción, etc.) [38].

En el medio laboral, siempre que se haga uso del material de protección apropiado, la vía dérmica es la más importante, ya que a través de ella, y en función de la superficie expuesta se absorben cantidades significativas de diversos plaguicidas [39]. En la población, en general, la vía de absorción más importante es la digestiva debido a ingerir alimentos o aguas contaminadas [39].

Cuando los plaguicidas organoclorados se introducen en el organismo se distribuyen a través del torrente sanguíneo. Según la afinidad del compuesto

 Universitat d'Alacant Universidad de Alicante	<i>Optimización y puesta a punto de métodos para la determinación de plaguicidas organoclorados mediante técnicas cromatográficas. Automatización de métodos.</i> <i>Trabajo Fin de Máster – Máster en Ingeniería Química</i>	 LABAQUA
---	--	--



(liposoluble o hidrosoluble) se adherirá a unos u otros órganos. En el caso concreto de los compuestos organoclorados se acumulan en tejidos adiposos y nerviosos de los seres humanos [40]. Por medio de reacción metabólicas (oxidación, reducción etc.) catalizadas normalmente por enzimas hepáticas se producen metabolitos que pueden ligarse a moléculas endógenas, sintetizándose así compuestos solubles en agua y fácilmente eliminables. Estos procesos pueden dar como resultado sustancias tóxicamente más activas que el compuesto original conllevando un grave problema para la salud de la persona [40].

Cada plaguicida tiene efectos diferentes, dichos efectos abarcan desde la desestabilización hormonal, hasta el cáncer. Los organoclorados de manera general producen alteraciones metabólicas al desencadenar la formación de enzimas y lesiones del sistema nervioso central, alterando el transporte de iones de sodio y potasio desorganizando los potenciales de las membranas [21].

Algunos organoclorados como es el caso del endosulfán, provocan la disminución de los niveles de magnesio y calcio en el plasma sanguíneo [41]. Otros como el DDT y sus metabolitos como el p,p'DDT y el p',pDDE, tienen un efecto de disrupción endocrina alterando el equilibrio hormonal, como consecuencia a la exposición al DDT y compuestos similares se ha reportado: reducción de la fertilidad, defectos congénitos urogenitales (sexo masculino), problemas de amamantamiento, diabetes de tipo 2 y cáncer [42].

Hay numerosos estudios que evidencian la presencia de compuestos organoclorados (diendrin, DDT, DDE, HCH, heptacloro etc.) en el suero y la leche materna [43, 44, 45]. Estos compuestos se transfieren desde el tejido adiposo a la grasa presente en la leche materna durante la lactancia y las concentraciones determinadas en recién nacidos son comparables con las evaluadas en el medio. Dichas concentraciones en algunos casos han sido disminuidas tomando las medidas de protección adecuada en lo que respecta al uso de plaguicidas [46].

Aunque los niveles de concentración de compuestos organoclorados en los niños no es suficientemente elevada como para provocar una intoxicación aguda [47], si se han reportado casos de problemas congénitos [48], así como de crecimiento y desarrollo en niños. Como es el caso de los niños de la región agraria de Valley (México) que debido a la exposición a los plaguicidas organoclorados que recibieron sus madres durante el embarazo, contrajeron problemas neuromotores y de memoria. Los niños expuestos a plaguicidas mostraban más agresividad, menos creatividad y menos comportamientos grupales que los niños de localidades no expuestas a plaguicidas [49].

 Universitat d'Alacant Universidad de Alicante	<i>Optimización y puesta a punto de métodos para la determinación de plaguicidas organoclorados mediante técnicas cromatográficas. Automatización de métodos.</i> Trabajo Fin de Máster – Máster en Ingeniería Química	 LABAQUA
---	---	--

### 1.3. Diagnóstico del problema

#### 1.3.1. Validación del método

Como se ha comentado anteriormente, respecto a la repercusión de los plaguicidas organoclorados sobre el medio ambiente y la salud pública, y debido a la situación Española en lo que se refiere a la escasez de agua, se hace imprescindible el desarrollo de metodologías de análisis que permitan monitorear y dar una alerta temprana sobre las concentraciones de estos plaguicidas en todas las aguas naturales del territorio.

Es de vital importancia que los datos analíticos obtenidos sean fiables ya que muchas decisiones que se toman están basadas en la información obtenida de dichos resultados. Por ello, la implementación y aplicación de un método analítico robusto y eficiente es primordial.

Al margen de los requerimientos técnicos y organizativos, se requiere de una validación del método por medio de la cual se verifica de manera sistemática y estadística la efectividad analítica del mismo, partiendo de requerimientos como límites de detección o tipos de matriz. La validación (basada en la norma ISO-900, de la ISO 17025 y de la guía G-ENAC 9) confirma que el método es confiable y robusto, permitiendo que los análisis tengan un mayor reconocimiento a nivel europeo y mundial.



#### 1.4. Compuestos orgánicos semivolátiles a determinar

El objeto del procedimiento que se va a optimizar y validar en el presente trabajo son los plaguicidas semivolátiles organoclorados (**Tabla 1.4.1**). Estos compuestos pueden clasificarse según su estructura química en aromáticos clorados, cicloalcanos clorados y ciclodiénicos clorados [50].

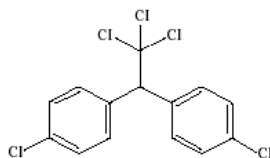
**Tabla 1.4.1:** Compuestos orgánicos semivolátiles contemplados en el presente estudio

Plaguicidas organoclorados		
Aromáticos clorados	Cicloalcanos clorados	Ciclodiénicos clorados
p,p'-DDT	a-HCH	Aldrín
p,p'-DDD	b-HCH	Dieldrín
p,p'-DDE	d-HCH	Endrín
o,p'-DDT	Lindano	Endosulfan I y II
metoxiclor	-	Heptaclor
-	-	Heptaclor epoxido
-	-	Endosulfan Sulfato
-	-	Endrin cetona

Los plaguicidas organoclorados son moléculas orgánicas que contienen por norma general, carbono e hidrógeno, conteniendo átomos de cloro, predominando estructuras cíclicas y aromáticas.



##### 1.4.1. Aromáticos clorados

Este grupo de compuestos está formado principalmente por el DDT y sus derivados (**tabla 1.4.1**). (**figura 1.4.1**).



**Figura 1.4.1.** Estructura molecular del DDT.

El DDT es un sólido cristalino, incoloro e insoluble en agua pero soluble en disolventes orgánicos como acetona, benceno y hexano. Las siglas DDT derivan de su nombre común que es dicloro-difenil-tricloro-etano. Su nombre químico es [1,1,1-tricloro-2,2-bis(4-clorofenil)etano] [51].

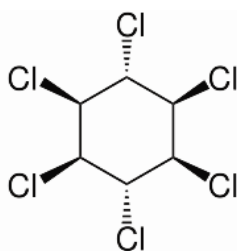
 Universitat d'Alacant Universidad de Alicante	<i>Optimización y puesta a punto de métodos para la determinación de plaguicidas organoclorados mediante técnicas cromatográficas. Automatización de métodos.</i> Trabajo Fin de Máster – Máster en Ingeniería Química	 LABAQUA
---	---	--

El DDT fue sintetizado por el científico Othmar Zeidler, y Paul Hermann Müller obtuvo del premio Nobel de fisiología y medicina por descubrir su uso como insecticida contra enfermedades infecciosas causadas por insectos vectores [23]. Durante la segunda guerra mundial y décadas posteriores se empleó masivamente debido a su bajo coste de producción y su elevada efectividad como insecticida y plaguicida [22].

El DDT se encuentra prohibido en Europa y EEUU debido a su riesgo para la salud y el medio ambiente, clasificado por la Organización Mundial de la salud según su peligrosidad como grupo IIB, ya que no hay suficientes pruebas en seres humanos, pero si en animales de experimentación [52]. Hay una controversia al respecto ya que es un compuesto empleado contra plagas y la lucha de enfermedades, por lo que sigue encontrándose en el medio ambiente y sigue empleándose en numerosos países subdesarrollados.

#### 1.4.2. Cicloalcanos clorados



Esta familia de compuestos se compone de los isómeros de los hexaciclohexanos destacando el gama HCH (**figura 1.4.2.**).



**Figura 1.4.2.** Estructura molecular del lindano

Es un sólido cristalino incoloro, moderadamente soluble en el etanol y aceites minerales, soluble en acetona y en solventes aromáticos, y como la mayoría de los organoclorados es insoluble en agua. Es estable a la luz, al aire y a los ácidos fuertes, por lo que es muy persistente en el medio [51].

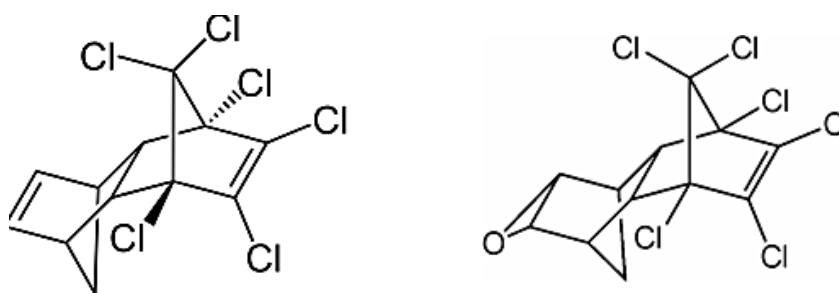
Empleado ampliamente en las décadas de los 60 y 70, actualmente se encuentra prohibido su uso, comercialización y producción como plaguicida. Se puede importar para uso químico en investigación. Esto se debe a que es un compuesto moderadamente tóxico y puede ser peligroso en humanos si no se manipula adecuadamente, clasificado por la OMS como grupo IIB al igual que el DDT [52].

 Universitat d'Alacant Universidad de Alicante	<i>Optimización y puesta a punto de métodos para la determinación de plaguicidas organoclorados mediante técnicas cromatográficas. Automatización de métodos.</i> Trabajo Fin de Máster – Máster en Ingeniería Química	 LABAQUA
---	---	--

### 1.4.3. Ciclodiénicos clorados



Este grupo se distinguen por presentar una estructura química formada por dos anillos y por poseer uno o dos puentes de metano, uno localizado en el anillo clorinado u otro en el anillo no clorinado. Dentro de este grupo se incluyen el aldrín, dieldrín, endrín, endosulfan I y II y los derivados de los mismos.

Estos compuestos fueron empleados y comercializados en las décadas de los 60 y 70, como plaguicidas e insecticidas. Por ejemplo el aldrín y su derivado dieldrín se empleaban para exterminar termitas y en las plantaciones de algodón [53] (**figura 1.4.3.**).



**Figura 1.4.3.** Estructura molecular del aldrín y el dieldrín, respectivamente.

Todos los ciclodiénicos comparten las mismas propiedades que el resto de organoclorados, poco solubles en agua y muy solubles en disolvente orgánicos [51]. Son perjudiciales para la salud. Cabe destacar que ninguno de los compuestos nombrados se fabrica ni comercializa en Europa o EEUU debido a su persistencia en el medio ambiente a sus consecuencias para la salud pública [52].

 <p>Universitat d'Alacant Universidad de Alicante</p>	<p><i>Optimización y puesta a punto de métodos para la determinación de plaguicidas organoclorados mediante técnicas cromatográficas. Automatización de métodos.</i></p> <p><i>Trabajo Fin de Máster – Máster en Ingeniería Química</i></p>	
--	---	---

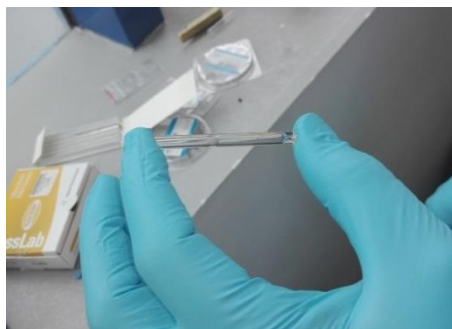
### 1.5. Cromatografía de gases con detección mediante un espectrómetro de masas con triple cuadrupolo.

Las técnicas cromatográficas de gases (GC) y espectrometría de masas (MS), son imprescindibles en los análisis ambientales, forenses, de productos naturales y en muchas más áreas de investigación. El detector por espectrometría de masas tiene una alta capacidad selectiva ya que reconoce la información estructural del compuesto basándose en picos de fragmentación patrón y masa de los iones [54]. El cromatógrafo empleado en el presente estudio es un espectrómetro de masas con triple cuadrupolo TQ GC/MS/MS (**figura 1.5.1.**) en el cual se realizan dos fragmentaciones de iones.





**Figura 1.5.1.** Cromatógrafo triple cuadrupolo TQ GC/MS/MS Bruker.

La muestra de matriz compleja se introduce al cromatógrafo por medio de una jeringa de grandes volúmenes (10  $\mu$ L). La inyección en Split se activa por medio del Software del equipo, realizándose a la entrada de la columna una división de flujo, desechándose parte del analito en forma de purga. Encontrándose la muestra en el Liner se precalienta, volatilizándola y adecuándola a las condiciones de la columna (**figura 1.5.2.**). Antes de cada inyección el equipo está programado para realizar una limpieza de hexano en la aguja y realizar una inyección de hexano para limpiar la columna de posibles impurezas.



**Figura 1.5.2.** Liner empleado para grandes volúmenes.

 Universitat d'Alacant Universidad de Alicante	<p><i>Optimización y puesta a punto de métodos para la determinación de plaguicidas organoclorados mediante técnicas cromatográficas. Automatización de métodos.</i></p> <p><i>Trabajo Fin de Máster – Máster en Ingeniería Química</i></p>	 LABAQUA
---	---	--

Posterior a la inyección, la muestra atraviesa la columna dónde se produce una separación de los compuestos contenidos en la misma, debida a la polaridad, peso molecular y características intrínsecas de los analitos. La columna empleada es una BR-5ms de 30 m x 0,25 mm recomendada por Bruker (**figura 1.5.3.**).





**Figura 1.5.3.** Columna capilar instalada en el interior del horno del GC.

La salida de la columna cromatográfica se encuentra conectada mediante la línea de transferencia a la cámara de ionización, donde se aceleran los iones hacía el analizados de masas. El flujo de gas portador es en todo el proceso helio a 1 mL/min. El esquina izquierda de la **figura 1.5.4.** se puede observar la zona de ionización anterior al triple cuadrupolo y posterior a la columna cromatográfica.

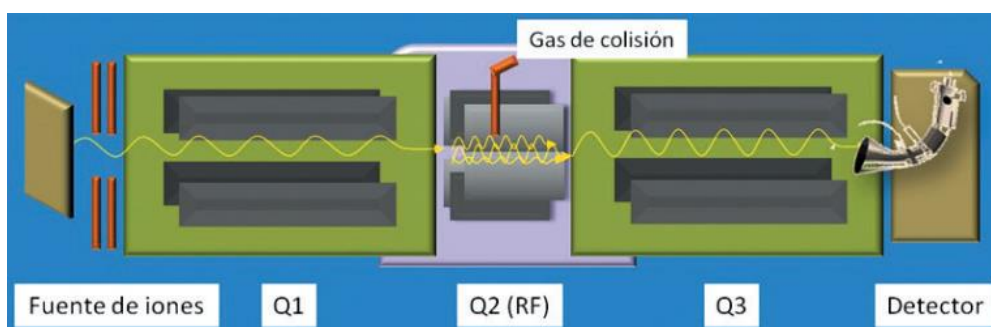


**Figura 1.5.4.** Triple cuadrupolo masas con detector EDR.

 Universitat d'Alacant Universidad de Alicante	<i>Optimización y puesta a punto de métodos para la determinación de plaguicidas organoclorados mediante técnicas cromatográficas. Automatización de métodos.</i> Trabajo Fin de Máster – Máster en Ingeniería Química	 LABAQUA
---	---	--

La espectrometría de masas, con un solo analizador de masas o unidimensional, puede alcanzar sus límites de resolución, sensibilidad, rango de masas y de volumen de información requerida elucidar una determinada estructura química [55]. En determinadas ocasiones en las que los espectros de masas resultan con poca señal o se percibe un exceso de ruido, resulta muy difícil establecer la estructura química de la molécula química de una manera confiable.

En este caso se dispone de un sistema tándem GC-MS con una espectrometría de masas multidimensional MS-MS. Durante el primer paso de separación de iones, en el primer masas (MS1), se realiza un clean-up específico distinguiendo los iones propios del analito y las interferencias, y registrando sólo las señales características del analito-target. Posteriormente el ion seleccionado se hace colisionar con Argón formando, debido a su disociación, iones-fragmento o iones-producto. Los iones-producto son distinguidos en el segundo masas (MS2) seguido de un detector EDR (**figura 1.5.5**).



**Figura 1.5.5.** Aspecto general de un GC-MS/MS con un analizador de masas de triple cuadrupolo [56].

El resultado final es la obtención de un cromatograma de los analitos como se puede observar en la **figura 1.5.6**.

### Chromatogram Plot 1 - 1/25/2017 9:56 AM

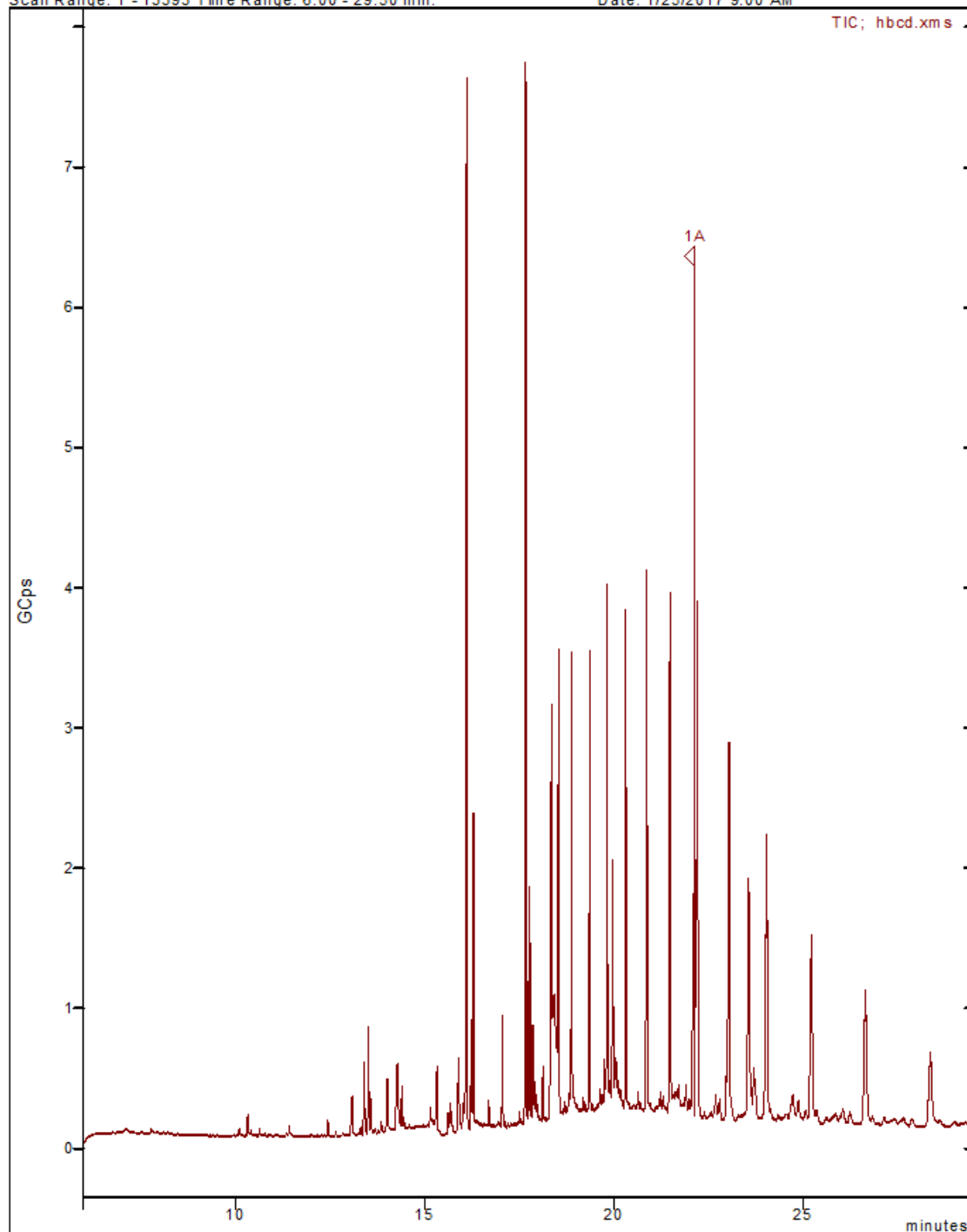
File: d:\data\2017\adquisicion de datos\01-enero\04012016\hbcd.xms

Sample: hbcd

Operator: JSM



Scan Range: 1 - 13393 Time Range: 6.00 - 29.50 min.

Date: 1/25/2017 9:00 AM



**Figura 1.5.6.** Ejemplo de cromatograma barrido TIC.



 Universitat d'Alacant Universidad de Alicante	<i>Optimización y puesta a punto de métodos para la determinación de plaguicidas organoclorados mediante técnicas cromatográficas. Automatización de métodos.</i> Trabajo Fin de Máster – Máster en Ingeniería Química	 LABAQUA
---	---	--

## 2. Objeto y alcance del proyecto

El presente proyecto tiene como alcance poner a punto un método cromatográfico para la determinación de compuestos orgánicos semivolátiles en muestras de agua. Aunque el método a validar sirve para determinar una elevada cantidad de compuestos contaminantes, como contaminantes emergente y prioritarios, el alcance del mismo se limita a la determinación de los plaguicidas organoclorados.

Los métodos utilizados en la detección de dichos compuestos están descritos por procedimientos internos de la empresa LABAQUA. Su determinación se realiza mediante un análisis de las muestras por cromatografía de gases con detección mediante un espectrómetro de masas con triple cuadrupolo.



La validación tiene como objetivo un nuevo método que sea suficientemente robusto para ser usado, basándose en determinados parámetros de estudio. Este nuevo método está basado en la tecnología  $\mu$ Drop. Este método en cuestión, a diferencia de los empleados actualmente, introduce el uso de un nuevo líquido extractante mediante el cual se obtiene una mayor recuperación de los analitos con una relación de volumen y tiempo mucho menores que con los disolventes empleados actualmente. La puesta a punto de este método permitirá el análisis de un mayor número de muestras en un menor tiempo y con menor volumen de muestra, pudiendo analizar los resultados analíticos.

La obtención de resultados rápidamente ofrece la oportunidad de poder tomar medidas y poder reaccionar lo antes posible a incidentes de contaminación por plaguicidas organoclorados.

Para la validación se han establecido los siguientes objetivos a cumplir:

- Sensibilidad: La técnica debe tener suficiente sensibilidad como para cumplir con lo establecido en las legislaciones. Se ha marcado como objetivo un límite de cuantificación de 0.5 ng/L para el o,p'-DDT y el endosulfan I y II; para el resto el límite es de 1 ng/L.
- Incertidumbre. Inferior al 40% para un margen de seguridad de  $k=2$ .
- Repetibilidad y reproducibilidad: < 20%
- Exactitud: < 2%



 Universitat d'Alacant Universidad de Alicante	<i>Optimización y puesta a punto de métodos para la determinación de plaguicidas organoclorados mediante técnicas cromatográficas. Automatización de métodos.</i> Trabajo Fin de Máster – Máster en Ingeniería Química	 LABAQUA
---	---	--

### 3. Procedimiento para la determinación de plaguicidas organoclorados contaminantes

Este procedimiento se puede emplear para el análisis de aguas con diferentes matrices: potables, continentales, residuales y de mar. La validación se realizará siempre en agua residual ya que es el escenario más desfavorable. El alcance del procedimiento es diferente para cada compuesto como se puede apreciar en la **tabla 3.1**.



**Tabla 3.1.** Alcance del procedimiento para plaguicidas organoclorados

Alcance	Compuesto
Desde 0,5 ng/L hasta 200 ng/L	Endosulfan I, Endosulfan II y o,p'-DDT
Desde 1 ng/L hasta 100 ng/L	Aldrín, Dieldrín, Endrín, Lindano, p,p'-DDT, p,p'-DDD, p,p'-DDE, metoxiclor, a-HCH, b-HCH, d-HCH, Heptaclor, Heptaclor epóxido, Endosulfan Sulfato y Endrin cetona

Previamente al análisis de las muestras hay que asegurarse de que se tienen las disoluciones mixtas de calibración y verificación. Para preparar las disoluciones mixtas de calibración y verificación serán usados sólidos puros de los compuestos y/o disoluciones comerciales de algunos compuestos, en este caso se partirá de disoluciones comerciales de marcas como Sigma (Alemania) o Aldrich Chemistry (Reino Unido).

A partir de la disolución comercial concentrada (2000 mg/L) se preparan dos disoluciones intermedias (una de calibración y otra de verificación) de 1 mg/L en acetona para poder posteriormente preparar las soluciones mixtas de calibración y verificación. Estos preparados tienen una caducidad de 6 meses a partir de su fecha de preparación. Con la disolución de 1 mg/L se preparan disoluciones de verificación y calibración de 10 µg/L en metanol, disolviendo 100 µL de la disolución intermedia en acetona y enrasando con metanol en un matraz aforado de 10 mL, y mediante la dilución de la disolución de 10 µg/L se prepara una disolución de 1 µg/L. Estas muestras tienen una caducidad de 2 meses.

También se prepara la disolución de patrón interno PCB 30 de 10 mg/L en acetona a partir de la solución comercial de PCB 30, con caducidad de 2 años. Partiendo de la disolución PCB 30 de 10 mg/L se prepara una disolución de trabajo de PCB 30 de 10 µg/L con caducidad de 2 meses.

 Universitat d'Alacant Universidad de Alicante	<i>Optimización y puesta a punto de métodos para la determinación de plaguicidas organoclorados mediante técnicas cromatográficas. Automatización de métodos.</i> Trabajo Fin de Máster – Máster en Ingeniería Química	 LABAQUA
---	---	--



Preparadas todas las disoluciones necesarias se comienza con el ensayo preparando la recta, empleando los patrones, de calibración y cuatro verificaciones. Posteriormente se preparan muestras de 500 ml con una concentración de plaguicidas organoclorados conocida y se procede con el análisis de las muestras por cromatografía (tabla 3.2.).

La preparación de muestras consiste en introducir 35 mL de muestra en un tubo de fondo cónico al que se le añade el patrón interno y 1 g de sal. Se agita el tubo de fondo cónico hasta que se disuelve por completo la sal y se le introduce un volumen de 3,22 mL del agente extractante, y se cierra el tubo. Se agita vigorosamente para poner en contacto ambas fases y promover el desplazamiento de los analitos hacia el disolvente extractante. Después de unas cuatro agitaciones durante un intervalo de tiempo de unos 15 minutos se introducen las muestras en una centrifugadora a 2500 rpm durante 20 min. En el fondo del tubo se concentra una gota de disolvente de unos 40  $\mu$ L la cual es extraída con una jeringa e introducida en un vial para su posterior inyección y análisis.

**Tabla 3.2.** Concentración de patrones de calibración y verificación, y preparación de muestras.



	[ ] final (ng/l)	V final (mL)	[ ] patrón ( $\mu$ g/L)	mL patrón	PI $\mu$ L
Calibración	0,1	35	1	3,5	17,5
	0,2	35	1	7	17,5
	0,5	35	1	17,5	17,5
	1	35	1	35	17,5
	5	35	10	17,5	17,5
	10	35	10	35	17,5
	50	35	10	175	17,5
Verificación	0,2	35	1	7	17,5
	1,5	35	1	52,5	17,5
	8	35	10	28	17,5
	40	35	10	140	17,5

Posterior al inyector PTV se introduce la muestra en una columna de 30 m x 0,25 mm, 0,25  $\mu$ m con un tiempo de análisis de 29 min y con una rampa de temperatura especificada por el BRUKER. Se establece una rampa de temperatura en el PTV de 12  $^{\circ}$ C/s hasta alcanzar los 280  $^{\circ}$ C manteniéndose 3 min. En la columna se mantiene 70  $^{\circ}$ C durante 30 s y se establece una rampa de 25  $^{\circ}$ C/min hasta 170  $^{\circ}$ C, a continuación se aplica una segunda rampa a razón de 5  $^{\circ}$ C/min hasta 200  $^{\circ}$ C y finalmente se aumenta a razón de 10  $^{\circ}$ C/min hasta 280  $^{\circ}$ C y se mantiene durante 10 min.

 Universitat d'Alacant Universidad de Alicante	<i>Optimización y puesta a punto de métodos para la determinación de plaguicidas organoclorados mediante técnicas cromatográficas. Automatización de métodos.</i> Trabajo Fin de Máster – Máster en Ingeniería Química	 LABAQUA
---	---	--

El detector de masas de triple-cuadropolo (MS-Ms) está ajustado para la adquisición de las transiciones características y más abundantes de cada compuesto. La identificación se realiza a través del tiempo de retención (los cuales se conocen y se encuentra en el procedimiento) de las transiciones características de cada compuesto.

Se realiza la integración de los cromatogramas correspondientes a la calibración mediante el software del equipo, obteniéndose para cada compuesto una respuesta en *cunetas de área para su respectivo ión de cuantificación previamente seleccionado*. Con los puntos de calibración se realizará la curva de calibrado. La regresión de la curva ha de ser igual o superior a 0,999 ( $r^2 > 0,999$ ). En el caso de que en la curva de calibrado no se obtenga un valor de regresión igual o superior a 0,999 se podrá eliminar 1 punto cualquiera de la recta para ajustar dicho valor. Con esta recta de calibrado se procesan los cromatogramas de las verificaciones, el blanco (normalmente hexano) y las muestras obteniéndose los resultados directamente en ng/L.

 Universitat d'Alacant Universidad de Alicante	<i>Optimización y puesta a punto de métodos para la determinación de plaguicidas organoclorados mediante técnicas cromatográficas. Automatización de métodos.</i> Trabajo Fin de Máster – Máster en Ingeniería Química	 LABAQUA
---	---	--



#### 4. Optimización del método de extracción

Para la optimización del método de extracción se estudiarán diferentes variables como el tiempo de extracción, el tipo de disolvente o la relación de volúmenes.

##### 4.1. Tipo de disolvente

Se contemplaron 3 disolventes: hexano, diclorometano y bálsamo  $\mu$ drop. El hexano (HEX) y diclorometano (DCM) son disolventes puros que se emplean como agentes extractantes en numerosos análisis, y el  $\mu$ drop es un agente nuevo proporcionado por la marca Bruker que no es un disolvente puro, si no que contiene un dispersante el cual facilita el contacto entre fases formando microgotas del mismo en el seno de la muestra, favoreciendo el contacto entre fases.

Se realizaron 6 análisis con cada uno, manteniendo el resto de variables constante para que el proceso fuera idéntico en todas las réplicas y evitar que los resultados se pudieran ver afectados. Se desechó una tanda de muestras debido a un error humano en la extracción del disolvente quedándose 5 muestras finales de cada disolvente. Realizando un promedio de los resultados por cuentas de área (**tabla 4.1.1.**) y posteriormente obteniéndose el porcentaje de recuperación respecto el  $\mu$ drop se obtuvo los resultados que se encuentran en la **tabla 4.1.2.**

 Universitat d'Alacant Universidad de Alicante	<i>Optimización y puesta a punto de métodos para la determinación de plaguicidas organoclorados mediante técnicas cromatográficas. Automatización de métodos.</i> <i>Trabajo Fin de Máster – Máster en Ingeniería Química</i>	 LABAQUA
---	--	--



**Tabla 4.1.1.** Promedio por cuenta de áreas de los 3 disolventes evaluados.

Compuesto	DCM	HEX	μdrop
a-HCH	499	2972	72001
Aldrin	71	1430	25203
b-HCH	712	4628	151083
d-HCH	81	736	23735
Dieldrin	0	562	9967
Endosulfan I	215	1640	29702
Endosulfan II	156	1020	23909
Endosulfan Sulfato	434	2163	47609
Endrin	29	143	6280
Endrin cetona	72	341	11291
Heptaclor	68	167	5819
Heptaclor epoxido	151	1082	25323
Lindano	127	790	19793
o,p'-DDD	3942	21729	396133
o,p'-DDE	208	1598	26825
o,p'-DDT	5538	38531	859117
p,p'-DDD	5820	38826	867933
p,p'-DDE	528	4456	74953
p,p'-DDT	109	196	106520
PCB-30	742	4105	83701
Metoxiclor	0	0	72174

**Tabla 4.1.2.** Porcentaje de recuperación respecto a la máxima recuperación proporcionada por el  $\mu$ drop.

DCM % rec.	HEX % rec.	$\mu$ drop % rec.
0,7 %	4,1 %	100,0 %
0,3 %	5,7 %	100,0 %
0,5 %	3,1 %	100,0 %
0,3 %	3,1 %	100,0 %
0,0 %	5,6 %	100,0 %
0,7 %	5,5 %	100,0 %
0,7 %	4,3 %	100,0 %
0,9 %	4,5 %	100,0 %
0,5 %	2,3 %	100,0 %
0,6 %	3,0 %	100,0 %
1,2 %	2,9 %	100,0 %
0,6 %	4,3 %	100,0 %
0,6 %	4,0 %	100,0 %
1,0 %	5,5 %	100,0 %
0,8 %	6,0 %	100,0 %
0,6 %	4,5 %	100,0 %
0,7 %	4,5 %	100,0 %
0,7 %	5,9 %	100,0 %
0,1 %	0,2 %	100,0 %
0,9 %	4,9 %	100,0 %
0,0 %	0,0 %	100,0 %

Los resultados obtenidos de los diferentes disolventes fueron concluyentes, ya que el porcentaje de recuperación de analitos del  $\mu$ drop es aproximadamente de 50 veces mayor que el hexano y 90 veces mayor que el diclorometano. Estos resultados son debidos a que el bálsamo  $\mu$ drop contiene un dispersante que forma microgotas del líquido extractante permitiendo un contacto entre fases más íntimo promoviendo una transferencia mayor de analitos. A diferencia del  $\mu$ drop el hexano y diclorometano no se dispersan con la misma facilidad y durante el periodo de agitación no se consigue un contacto entre fases tan bueno, por lo que se debería de requerir de más tiempo de agitación o una relación de volumen mayor para conseguir resultados semejantes.



 Universitat d'Alacant Universidad de Alicante	<i>Optimización y puesta a punto de métodos para la determinación de plaguicidas organoclorados mediante técnicas cromatográficas. Automatización de métodos.</i> Trabajo Fin de Máster – Máster en Ingeniería Química	 LABAQUA
---	---	--

## 4.2. Tiempo de extracción

Se realizaron diferentes análisis con diferentes tiempos de extracción (agitación). Se realizaron dos comparativas opuestas, en una se realiza una única agitación vigorosa y fuerte durante 10s antes de introducir la muestra en la centrifugadora, y en otra se realizaron 4 agitaciones durante 1h (1 agitación cada 15 min). Los resultados no fueron concluyentes no se podía apreciar una mejoría considerable entre un método u otro ya que en unas ocasiones se recuperaba más con menor tiempo de agitación y en otras ocasiones se recuperaba menos. En la **tabla 4.2.1.** se muestran algunos de los resultados obtenidos.

**Tabla 4.2.1.** Resultados en cuentas de área obtenidos al variar el tiempo de extracción

Compuesto	Cuentas de área			
	Analista ASM 1 agitación	Analista ASM 4 agitaciones	Analista JSM 1 agitación	Analista JSM 4 agitaciones
a-HCH	88780	88486	64239	70739
Aldrin	26766	26748	24416	21511
b-HCH	169398	176712	164077	140538
d-HCH	29106	28869	27156	22606
Dieldrin	11271	11458	9778	9022
Endosulfan I	29811	32086	32011	27834
Endosulfan II	27097	29388	25413	21447
Endosulfan Sulfato	51547	54399	47191	46201
Endrin	6907	7446	7457	5658
Endrin cetona	12731	14721	13528	10870
Heptaclor	8050	7747	4316	5588
Heptaclor epoxido	27674	29557	24925	21255
Lindano	23905	24906	18773	18561
o,p'-DDD	412519	471799	441374	375174
o,p'-DDE	26870	28346	31314	24551
o,p'-DDT	1,00E+06	1,02E+06	951844	849682
p,p'-DDD	990715	1,01E+06	971888	863148
p,p'-DDE	78293	83387	88439	67689
p,p'-DDT	150130	126282	139835	92152
PCB-30	87119	96190	87276	78344
Metoxiclor	106959	94790	86107	63890

 Universitat d'Alacant Universidad de Alicante	<i>Optimización y puesta a punto de métodos para la determinación de plaguicidas organoclorados mediante técnicas cromatográficas. Automatización de métodos.</i> <i>Trabajo Fin de Máster – Máster en Ingeniería Química</i>	 LABAQUA
---	--	--

Aunque en el procedimiento proporcionado por la marca Bruker se especifican cuatro agitaciones durante una hora se puede considerar excesivo ese tiempo de agitación. Debido a los resultados se puede concluir que el periodo de agitación no es determinante en la extracción, lo cual puede ser debido a que la dispersión del bálsamo en la muestra es por sí misma suficiente sin la necesidad de una agitación de tan larga duración. Que no sea necesario agitar durante tanto tiempo es un dato muy positivo ya que permite hacer más rápidas las muestras y obtener los resultados antes, reduciendo el tiempo de entrega de resultados al cliente.

#### **4.3. Relación de volúmenes**

Se planteó en un principio variar la relación de volúmenes con el objetivo de poder ahorrar disolvente, reducir el volumen de muestra necesario u obtener una mejor señal de análisis; pero debido a que se obtuvieron tan buenos resultados comparando la recuperación del bálsamo respecto a los disolventes empleados normalmente en Labaqua para estos análisis, y el volumen tan bajo de muestra y de bálsamo que se requiere para realizar el análisis y la corta duración del mismo, se consideró innecesario realizar este estudio. Es de aclarar que otros procedimientos de Labaqua que se emplean para este tipo de analitos requieren de 200 ml de muestra, 5 ml de disolvente y al menos un día de agitación (extracción), comparado con los 35 ml de muestra, 3,22 ml de disolvente y la extracción prácticamente instantánea del  $\mu$ drop, intuitivamente se aprecia la superioridad de este procedimiento que emplea el bálsamo  $\mu$ drop.



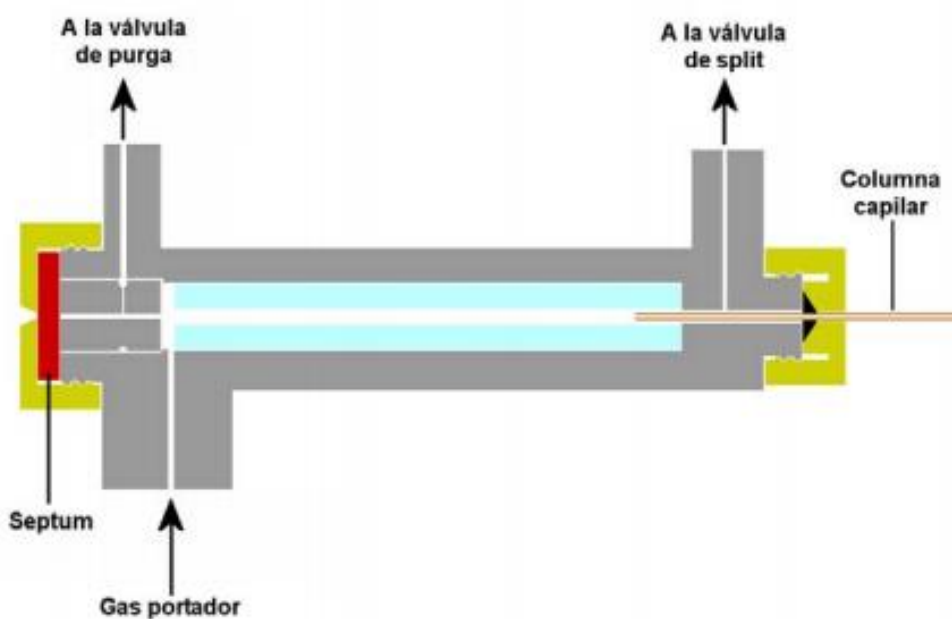
## 5. Optimización del método cromatográfico

Para la optimización del método cromatográfico se estudiarán las condiciones de la temperatura del inyector. La rampa cromatográfica empleada actualmente ya ha sido optimizada y el detector de masas (ión precursor mayoritario y condiciones de celda de colisión e iones hijos) está configurado adecuadamente, por todo ello sólo se estudiará la temperatura de inyección.

### 5.1. Temperatura del inyector

El inyector anterior a la columna debe ser capaz de vaporizar la muestra y mezclarla con el gas portador facilitando la introducción de una alícuota de muestra a la columna en las condiciones adecuadas. La jeringa empleada es de grandes volúmenes (10  $\mu\text{L}$ ) y el método empleado aplica una rampa de temperatura en el inyector.

El inyector “split” (**figura 5.1.1**), consta básicamente de los mismos elementos de un inyector normal, con la única adición de un sistema de división de flujo a la salida de la cámara de mezcla. El flujo de gas portador que pasa a través del inyector (y la muestra vaporizada) se divide en dos; una parte es introducida en la columna y la otra escapa fuera del sistema a través de una válvula de aguja que permite regular la proporción de gas que es introducida en la columna.



**Figura 5.1.1.** Esquema de un inyector en “Split”.

En este tipo de análisis de trabaja a temperatura variable, es decir con una rampa de temperatura en el inyector hasta que alcanza los 280 °C (temperatura de la columna). Se hizo una prueba con el PTV fijo a (280 °C) y otra con PTV variable empleando como muestra un patrón que contenía todos los compuestos objeto de estudio, obteniéndose los resultados de la **tabla 5.1.1**.

**Tabla 5.1.1.** Cuentas de área para plaguicidas organoclorados variando las condiciones del PTV.

Compuestos	PTV fijo	PTV variable
a-HCH	3378	80295
Aldrín	1760	48937
b-HCH	5082	133088
d-HCH	1113	10811
Dieldrín	1071	13458
Endosulfan I	346	33240
Endosulfan II	1356	19869
Endosulfan sulfato	3666	73138
Endrín	0	7741
Endrín cetona	450	8035
Heptaclor	393	6103
Heptaclor epoxido	914	38137
Lindano	890	22762
Metoxiclor	4148	54912
p,p' -DDD	25410	678662
p,p' -DDE	3612	125685
p,p' -DDT	8447	109407

Al mantener la temperatura fija en el inyector se obtuvo una menor señal en el detector de masas para todos los compuestos, aunque no se vio afectado el tiempo de retención de los mismos. La vaporización de la muestra con PTV fijo se produce abruptamente produciéndose la vaporización de toda la muestra introducida, mientras que con PTV variable se produce una vaporización controlada en la que no se evapora toda la muestra a la vez, sino que se va evaporando por diferencia de volatilidades de los compuestos, produciéndose una separación previa. La inyección en “Split” pierde parte de la muestra y del gas portador, por lo que a PTV variable se pierde menos muestra ya que se volatiliza lentamente según la rampa de temperatura. Se llega a la conclusión de que con PTV fijo no se obtiene una separación diferente (tiempos de retención) ni una mayor señal, ya que al volatilizarse toda la muestra al unísono se pierde mayor cantidad de la misma por la válvula de “Split”.

## 6. Validación



La validación de un método analítico es el proceso por el cual se establece, mediante estudios de laboratorio, que el método cumple con los requisitos previstos. El objetivo es evaluar el método analítico y comprobar que es un método adecuado y robusto. Se evaluará en método cromatográfico para los plaguicidas organoclorados objeto de estudio (véase 1.4). Se considerará en la validación la repetibilidad, la reproducibilidad, la exactitud y la incertidumbre del método cromatográfico para muestras en agua residual.

### 6.1. Límites de cuantificación

El límite de cuantificación obtenido se muestra en la tabla **6.1.1**.

**Tabla 6.1.1.** Límite de cuantificación de los compuestos organoclorados

Compuesto	Límite de cuantificación ( ng/L)
Aldrín	1
Dieldrín	1
Endrín	1
Lindano	1
Endosulfan I	0,5
Endosulfan II	0,5
p,p'-DDT	1
p,p'-DDD	1
p,p'-DDE	1
o,p'-DDT	0,5
Metoxiclor	1
a-HCH	1
b-HCH	1
d-HCH	1
Heptaclor	1
Heptaclor epoxido	1
Endosulfan Sulfato	1
Endrín cetona	1

 Universitat d'Alacant Universidad de Alicante	<i>Optimización y puesta a punto de métodos para la determinación de plaguicidas organoclorados mediante técnicas cromatográficas. Automatización de métodos.</i> Trabajo Fin de Máster – Máster en Ingeniería Química	 LABAQUA
---	---	--

## 6.2. Repetibilidad

Se puede considerar que un método es repetitivo cuando hay proximidad concordante entre los resultados de análisis sucesivos llevados a cabo en las mismas condiciones. Se realizaron 6 análisis, el mínimo considerado por el procedimiento de validación interno de LABAQUA, manteniendo invariable el procedimiento de medición, el analista, el equipo, el día, patrón etc.

Obtenidos los resultados se calcula la desviación estándar muestral ( $S_r$ ) (ecuación 1) y el coeficiente de variación o repetibilidad ( $r$ ) (ecuación 2).

$$S_r = \sqrt{\frac{\sum(x - \bar{x})^2}{(n - 1)}} \quad (\text{ecuación 1})$$

$$r = \frac{S_r}{\bar{x}} \quad (\text{ecuación 2})$$



## 6.3. Reproducibilidad

La reproducibilidad es la proximidad de concordancia entre resultados realizados bajo condiciones de trabajo diferentes. En este estudio se varió el analista encargado de realizar la preparación de muestras y los días en los que se realizaba la preparación de muestras y el análisis.

Se debe realizar un mínimo de 5 muestras variando entre ellas algún factor de los mencionados con anterioridad y comprobar, análogamente a la repetibilidad, la desviación estándar muestral ( $S_R$ ) (ecuación 3) y el coeficiente de variación o reproducibilidad ( $R$ ) (ecuación 4).

$$S_R = \sqrt{\frac{\sum(x - \bar{x})^2}{(n - 1)}} \quad (\text{ecuación 3})$$

$$R = \frac{S_R}{\bar{x}} \quad (\text{ecuación 4})$$

 Universitat d'Alacant Universidad de Alicante	<p><i>Optimización y puesta a punto de métodos para la determinación de plaguicidas organoclorados mediante técnicas cromatográficas. Automatización de métodos.</i></p> <hr/> <p><i>Trabajo Fin de Máster – Máster en Ingeniería Química</i></p>	 LABAQUA
---	---	--

#### 6.4. Incertidumbre



La incertidumbre (I) es la estimación unida al resultado de un ensayo que caracteriza el intervalo de valores dentro de los cuales se afirma que está el valor verdadero. El término incertidumbre considera todas las fuentes de error que intervienen en el resultado final.

La incertidumbre y los factores internos se han calculado acorde con: “UNE-EN ISO 17025. Requisitos generales relativos a la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración.” Y Guía G-ENAC 9 “Guía para la expresión de la incertidumbre de los resultados cuantitativos”.

#### 6.5. Exactitud

La exactitud es la capacidad de aproximación a un valor teórico o real, en este caso el valor teórico.

Se ha realizado siguiendo con los criterios y ecuaciones basadas en las normas “UNE-EN ISO 17025. Requisitos generales relativos a la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración.” Y Guía G-ENAC 9 “Guía para la expresión de la incertidumbre de los resultados cuantitativos”.

 Universitat d'Alacant Universidad de Alicante	Optimización y puesta a punto de métodos para la determinación de plaguicidas organoclorados mediante técnicas cromatográficas. Automatización de métodos. Trabajo Fin de Máster – Máster en Ingeniería Química	 LABAQUA
---	--	--



## 7. Resultados

### 7.1. Repetibilidad

Se realizaron numerosos análisis, tal y como se explica en el apartado 3 del presente trabajo. Dependiendo de la disponibilidad del equipo y del tiempo disponible se realizaban análisis de 12, 10 u 8 muestras, por si alguna presentaba algún fallo en la preparación, poder disponer de las 6 mínimas que exige el procedimiento interno. En la **tabla 7.1.1** y **7.1.2** se muestran los resultados obtenidos.

**Tabla 7.1.1.** Resultados obtenidos de la repetibilidad (baja concentración)

Compuesto	Valor teórico ( $V_t$ ) / ng/L	Valor medio ( $\bar{x}$ ) / ng/L	Desviación estandar ( $S_r$ ) / ng/L	Repetibilidad (r) / %
Aldrín	1	1,091	0,04	3,4
Dieldrín	1	1,060	0,06	5,6
Endrín	1	0,989	0,09	9,3
Lindano	1	1,016	0,11	10,3
Endosulfan I	0,5	0,477	0,06	12,5
Endosulfan II	0,5	0,445	0,03	6,6
p,p'-DDT	1	0,943	0,07	6,9
p,p'-DDD	1	1,023	0,07	6,4
p,p'-DDE	1	1,003	0,07	7,4
o,p'-DDT	0,5	0,482	0,08	15,8
Metoxiclor	1	0,914	0,07	7,6
a-HCH	1	1,033	0,04	4,4
b-HCH	1	0,974	0,10	10,6
d-HCH	1	0,887	0,05	5,7
Heptaclor	1	1,030	0,07	7,2
Heptaclor epoxido	1	1,048	0,07	6,2
Endosulfan Sulfato	1	0,954	0,10	10,6
Endrín cetona	1	1,038	0,06	5,6

 Universitat d'Alacant Universidad de Alicante	Optimización y puesta a punto de métodos para la determinación de plaguicidas organoclorados mediante técnicas cromatográficas. Automatización de métodos. Trabajo Fin de Máster – Máster en Ingeniería Química	 LABAQUA
---	--	--

**Tabla 7.1.2.** Resultados obtenidos de la repetibilidad (alta concentración)

Compuesto	Valor teórico ( $V_t$ ) / ng/L	Valor medio ( $\bar{x}$ ) / ng/L	Desviación estandar ( $S_r$ ) / ng/L	Repetibilidad (r) / %
Aldrín	50	55,65	3,02	5,4
Dieldrín	50	55,55	2,02	3,6
Endrín	50	54,22	3,26	6,0
Lindano	50	51,98	3,70	7,1
Endosulfan I	50	51,30	1,89	3,7
Endosulfan II	50	45,31	5,99	13,2
p,p'-DDT	50	53,92	2,10	3,9
p,p'-DDD	50	53,13	2,75	5,2
p,p'-DDE	50	53,13	2,75	5,2
o,p'-DDT	50	51,99	1,39	2,7
Metoxiclor	50	56,62	2,23	3,9
a-HCH	50	52,65	4,40	8,4
b-HCH	50	51,65	2,92	5,7
d-HCH	50	50,73	4,11	8,1
Heptaclor	50	55,50	3,08	5,5
Heptaclor epoxido	50	49,87	4,23	8,5
Endosulfan Sulfato	50	55,14	3,00	5,4
Endrín cetona	50	50,52	4,09	8,1

Como puede observarse los resultados obtenidos se encuentran por debajo del 20% para el punto bajo y por debajo del 15% para el punto alto, valores adecuados según el procedimiento interno de LABAQUA. La repetibilidad da un mejor resultado en el punto alto, debido a que a mayor concentración el equipo detecta más analito obteniéndose una mayor señal.

Hubo complicaciones debidas al ensuciamiento del equipo, sobre todo en los puntos bajos. Cuando se realizan consecutivamente tantos análisis con inyección de grandes volúmenes (10  $\mu$ L) el equipo tiende a ensuciarse con impurezas de la muestra. Este ensuciamiento afecta lo suficiente para que algunos compuestos tuvieran dificultades para verse, y en el caso de que sólo un compuesto no se pudiera cuantificar en la curva de calibrado había que desechar todos los resultados.

Se ha realizado la validación para los puntos extremos de la curva de calibrado, por lo que los puntos intermedios también cumplen con la repetibilidad, al igual que las matrices de agua de mar, potable y continental también se contemplan ya que la repetibilidad se ha realizado con una matriz de agua residual, el caso más desfavorable.

## 7.2. Reproducibilidad

Durante días dispares se realizaron diferentes análisis variando la preparación de la muestra y el analista. Se realizó una selección de los datos más concordantes y se obtuvieron para cada compuesto como mínimo los 5 valores necesarios para cumplir el procedimiento interno de validación.

Los analistas que realizaron la preparación de muestras y los análisis fueron . Segura Morilla, y J. Salavert Martínez.

**Tabla 7.2.1.** Resultados obtenidos de la reproducibilidad (baja concentración)

Compuesto	Valor teórico ( $V_t$ ) / ng/L	Valor medio ( $\bar{x}$ ) / ng/L	Desviación estandar ( $S_R$ ) / ng/L	Reproducibilidad (R) / %
Aldrín	1	1,042	0,135	13,0
Dieltodrín	1	1,037	0,093	9,0
Endrín	1	1,038	0,090	8,7
Lindano	1	1,025	0,096	9,4
Endosulfan I	0,5	0,511	0,030	5,3
Endosulfan II	0,5	0,484	0,050	9,3
p,p'-DDT	1	0,897	0,169	18,9
p,p'-DDD	1	1,010	0,083	8,2
p,p'-DDE	1	1,046	0,095	9,1
o,p'-DDT	0,5	0,509	0,030	6,2
Metoxiclor	1	1,015	0,085	8,4
a-HCH	1	1,046	0,115	11,0
b-HCH	1	1,026	0,107	10,5
d-HCH	1	0,978	0,121	12,3
Heptaclor	1	1,018	0,123	12,1
Heptaclor epoxido	1	1,086	0,085	7,8
Endosulfan Sulfato	1	1,001	0,133	13,3
Endrín cetona	1	1,034	0,076	7,3



**Tabla 7.2.2.** Resultados obtenidos de la reproducibilidad (alta concentración)

Compuesto	Valor teórico ( $V_t$ ) / ng/L	Valor medio ( $\bar{x}$ ) / ng/L	Desviación estandar ( $S_R$ ) / ng/L	Reproducibilidad (R) / %
Aldrín	50	49,69	8,21	16,5
Dieldrín	50	49,26	7,41	15,0
Endrín	50	52,55	3,49	6,6
Lindano	50	52,18	6,95	13,3
Endosulfan I	50	52,40	4,91	9,4
Endosulfan II	50	45,23	6,68	14,8
p,p'-DDT	50	47,37	8,94	18,9
p,p'-DDD	50	52,27	4,76	9,1
p,p'-DDE	50	48,41	9,31	19,2
o,p'-DDT	50	51,37	5,93	11,6
Metoxiclor	50	48,46	8,46	17,5
a-HCH	50	52,27	5,09	9,7
b-HCH	50	53,58	2,88	5,4
d-HCH	50	52,64	2,67	5,1
Heptaclor	50	50,63	8,73	17,2
Heptaclor epoxido	50	50,17	4,61	9,2
Endosulfan Sulfato	50	47,57	9,18	19,3
Endrín cetona	50	50,14	3,68	7,3

Los valores obtenidos se encuentran por debajo del 20%, resultado adecuado según el procedimiento interno. Los resultados de reproducibilidad son empleados posteriormente para la trazabilidad obteniéndose que el método es trazable, por lo que la reproducibilidad es aceptable, ya que variando determinados factores, el método obtiene resultados reproducibles.

### 7.3. Incertidumbre

En las **tablas 7.3.1** y **7.3.2** se muestran los resultados obtenidos con un número (n) de muestras igual a 5 para el punto alto e igual a 6 para el punto bajo, aplicándose un factor corrector según número de muestras contempladas para el cálculo (w) de 1,3 y 1,4 respectivamente. Se obtiene como resultado la incertidumbre total I expresada en ng/L y en porcentaje, y la incertidumbre con un margen de seguridad k=2.

**Tabla 7.3.1.** Incertidumbre total obtenida baja concentración)

Compuesto	Concentración teórica ( $C_f$ ) / mg/L	Error de preparación ( $dC_f^d$ ) / mg/L	Incertidumbre de preparación (u)	Desviación estándar ( $S_R$ ) / ng/L	I (ng/L)	I (%)	I (%), k=2
Aldrín	$1 \cdot 10^{-6}$	$5,01 \cdot 10^{-8}$	0,050	0,135	0,169	16,9	34
Dieldrín	$1 \cdot 10^{-6}$	$5,01 \cdot 10^{-8}$	0,050	0,093	0,161	16,1	32
Endrín	$1 \cdot 10^{-6}$	$5,01 \cdot 10^{-8}$	0,050	0,090	0,160	16,0	32
Lindano	$1 \cdot 10^{-6}$	$5,01 \cdot 10^{-8}$	0,050	0,096	0,161	16,1	32
Endosulfan I	$5 \cdot 10^{-7}$	$1,61 \cdot 10^{-8}$	0,016	0,030	0,076	15,1	30
Endosulfan II	$5 \cdot 10^{-7}$	$1,61 \cdot 10^{-8}$	0,016	0,050	0,079	15,7	31
p,p'-DDT	$1 \cdot 10^{-6}$	$5,01 \cdot 10^{-8}$	0,050	0,169	0,177	17,7	35
p,p'-DDD	$1 \cdot 10^{-6}$	$5,01 \cdot 10^{-8}$	0,050	0,083	0,159	15,9	32
p,p'-DDE	$1 \cdot 10^{-6}$	$5,01 \cdot 10^{-8}$	0,050	0,095	0,161	16,1	32
o,p'-DDT	$5 \cdot 10^{-7}$	$1,61 \cdot 10^{-8}$	0,016	0,030	0,076	15,1	30
Metoxiclor	$1 \cdot 10^{-6}$	$5,01 \cdot 10^{-8}$	0,050	0,085	0,159	15,9	32
a-HCH	$1 \cdot 10^{-6}$	$5,01 \cdot 10^{-8}$	0,050	0,115	0,165	16,5	33
b-HCH	$1 \cdot 10^{-6}$	$5,01 \cdot 10^{-8}$	0,050	0,107	0,163	16,3	33
d-HCH	$1 \cdot 10^{-6}$	$5,01 \cdot 10^{-8}$	0,050	0,121	0,166	16,6	33
Heptaclor	$1 \cdot 10^{-6}$	$5,01 \cdot 10^{-8}$	0,050	0,123	0,166	16,6	33
Heptaclor epoxido	$1 \cdot 10^{-6}$	$5,01 \cdot 10^{-8}$	0,050	0,085	0,159	15,9	32
Endosulfan Sulfato	$1 \cdot 10^{-6}$	$5,01 \cdot 10^{-8}$	0,050	0,133	0,168	16,8	34
Endrín cetona	$1 \cdot 10^{-6}$	$5,01 \cdot 10^{-8}$	0,050	0,076	0,158	15,8	32

**Tabla 7.3.2.** Incertidumbre total obtenida (alta concentración)

Compuesto	Concentración teórica ( $C_f$ ) / mg/L	Error de preparación ( $dC_f^d$ ) / mg/L	Incertidumbre de preparación (u)	Desviación estándar ( $S_R$ ) / ng/L	I (ng/L)	I (%)	I (%), k=2
Aldrín	$5 \cdot 10^{-5}$	$1,55 \cdot 10^{-6}$	1,547	8,210	8,994	18,0	36
Dieldrín	$5 \cdot 10^{-5}$	$1,55 \cdot 10^{-6}$	1,547	7,410	8,718	17,4	35
Endrín	$5 \cdot 10^{-5}$	$1,55 \cdot 10^{-6}$	1,547	3,490	7,698	15,4	31
Lindano	$5 \cdot 10^{-5}$	$1,55 \cdot 10^{-6}$	1,547	6,950	8,568	17,1	34
Endosulfan I	$5 \cdot 10^{-5}$	$1,55 \cdot 10^{-6}$	1,547	4,910	7,996	16,0	32
Endosulfan II	$5 \cdot 10^{-5}$	$1,55 \cdot 10^{-6}$	1,547	6,680	8,484	17,0	34
p,p'-DDT	$5 \cdot 10^{-5}$	$1,55 \cdot 10^{-6}$	1,547	8,940	9,263	18,5	37
p,p'-DDD	$5 \cdot 10^{-5}$	$1,55 \cdot 10^{-6}$	1,547	4,760	7,960	15,9	32
p,p'-DDE	$5 \cdot 10^{-5}$	$1,55 \cdot 10^{-6}$	1,547	9,310	9,405	18,8	38
o,p'-DDT	$5 \cdot 10^{-5}$	$1,55 \cdot 10^{-6}$	1,547	5,930	8,262	16,5	33
Metoxiclor	$5 \cdot 10^{-5}$	$1,55 \cdot 10^{-6}$	1,547	8,460	9,085	18,2	36
a-HCH	$5 \cdot 10^{-5}$	$1,55 \cdot 10^{-6}$	1,547	5,090	8,040	16,1	32
b-HCH	$5 \cdot 10^{-5}$	$1,55 \cdot 10^{-6}$	1,547	2,880	7,598	15,2	30
d-HCH	$5 \cdot 10^{-5}$	$1,55 \cdot 10^{-6}$	1,547	2,670	7,568	15,1	30
Heptaclor	$5 \cdot 10^{-5}$	$1,55 \cdot 10^{-6}$	1,547	8,730	9,184	18,4	37
Heptaclor epoxido	$5 \cdot 10^{-5}$	$1,55 \cdot 10^{-6}$	1,547	4,610	7,925	15,9	32
Endosulfan Sulfato	$5 \cdot 10^{-5}$	$1,55 \cdot 10^{-6}$	1,547	9,180	9,355	18,7	37
Endrín cetona	$5 \cdot 10^{-5}$	$1,55 \cdot 10^{-6}$	1,547	3,680	7,732	15,5	31

La incertidumbre total no debe superar el 40% por lo que los resultados obtenidos son correctos. La incertidumbre de preparación del punto alto es más elevada debido a que la pipeta empleada tiene un mayor error asociado que la pipeta empleada para el punto bajo.



Los resultados son satisfactorios y concuerdan con lo esperado el método tienen una incertidumbre total dentro de lo esperado.

#### 7.4. Exactitud

Considerando un valor de confianza (k) igual a 2 y conociendo la incertidumbre del patrón (0,05), datos conocidos por el fabricante y suministrados de los compuestos puros, se procede al cálculo de la exactitud obteniéndose los resultados que se muestran en las **tablas 7.4.1 y 7.4.2.**

**Tabla 7.4.1.** Exactitud obtenida (baja concentración)



Compuesto	Valor teórico ( $V_t$ ) / ng/L	Valor medio ( $\bar{x}$ ) / ng/L	Desviación estandar ( $S_R$ ) / ng/L	Exactitud (E) / %
Aldrín	1	1,042	0,135	0,549
Dieldrín	1	1,037	0,093	0,663
Endrín	1	1,038	0,090	0,699
Lindano	1	1,025	0,096	0,432
Endosulfan I	0,5	0,511	0,030	0,387
Endosulfan II	0,5	0,484	0,050	0,463
p,p'-DDT	1	0,897	0,168	1,553
p,p'-DDD	1	1,010	0,083	0,188
p,p'-DDE	1	1,046	0,095	0,816
o,p'-DDT	0,5	0,509	0,030	0,310
Metoxiclor	1	1,015	0,085	0,279
a-HCH	1	1,046	0,115	0,693
b-HCH	1	1,026	0,107	0,421
d-HCH	1	0,978	0,121	0,318
Heptaclor	1	1,018	0,123	0,260
Heptaclor epoxido	1	1,086	0,085	1,666
Endosulfan Sulfato	1	1,001	0,133	0,007
Endrín cetona	1	1,034	0,076	0,708

 Universitat d'Alacant Universidad de Alicante	<i>Optimización y puesta a punto de métodos para la determinación de plaguicidas organoclorados mediante técnicas cromatográficas. Automatización de métodos.</i> Trabajo Fin de Máster – Máster en Ingeniería Química	 LABAQUA
---	---	--

**Tabla 7.4.2.** Exactitud obtenida (alta concentración)

Compuesto	Valor teórico ( $V_t$ ) / ng/L	Valor medio ( $\bar{x}$ ) / ng/L	Desviación estandar ( $S_R$ ) / ng/L	Exactitud (E) / %
Aldrín	50	49,69	8,21	0,060
Dieldrín	50	49,26	7,41	0,160
Endrín	50	52,55	3,49	1,167
Lindano	50	52,18	6,95	0,502
Endosulfan I	50	52,40	4,91	0,781
Endosulfan II	50	45,23	6,68	1,141
p,p'-DDT	50	47,37	8,94	0,470
p,p'-DDD	50	52,27	4,76	0,764
p,p'-DDE	50	48,41	9,31	0,273
o,p'-DDT	50	51,37	5,93	0,368
Metoxiclor	50	48,46	8,46	0,290
a-HCH	50	52,27	5,09	0,711
b-HCH	50	53,58	2,88	1,981
d-HCH	50	52,64	2,67	1,577
Heptaclor	50	50,63	8,73	0,116
Heptaclor epoxido	50	50,17	4,61	0,058
Endosulfan Sulfato	50	47,57	9,18	0,423
Endrín cetona	50	50,14	3,68	0,061

Se puede afirmar que el método es trazable si la exactitud se encuentra por debajo del 2%. Los cálculos se realizan en base a los datos de la reproducibilidad y tal como se puede observar todos los porcentajes se encuentran por debajo del 2%, así que el método cumple con este requisito de la validación.

 Universitat d'Alacant Universidad de Alicante	<i>Optimización y puesta a punto de métodos para la determinación de plaguicidas organoclorados mediante técnicas cromatográficas. Automatización de métodos.</i> Trabajo Fin de Máster – Máster en Ingeniería Química	 LABAQUA
---	---	--

## 8. Conclusiones

En los objetivos se marcó un límite de cuantificación para los compuestos objeto del presente trabajo. Dichos límites, que cumplen con la legislación actual, se alcanzaron con éxito (*Véase apartado 6.1. Límites de cuantificación*).



La repetibilidad y la reproducibilidad se encuentran por debajo del 20% tal y como se estipulaba en los objetivos a alcanzar (*Véase apartado 7.1. Repetibilidad y apartado 7.2. Reproducibilidad*). De forma general se obtienen mejores resultados para el punto alto, debido a que a mayor concentración el equipo detecta más analito obteniéndose una mayor señal. Hubo complicaciones debidas al ensuciamiento del equipo, sobre todo en los puntos bajos. Cuando se realizan consecutivamente tantos análisis con inyección de grandes volúmenes (10 µL) el equipo tiende a ensuciarse con impurezas de la muestra.

Con los datos de reproducibilidad obtenidos se calcula la exactitud del método obteniéndose como resultado si el método es trazable o no ( $\text{Exactitud} < 2\%$ ). El método es trazable para todos los compuestos organoclorados contemplados cumpliendo con el objetivo planteado (*véase apartado 7.4. Exactitud*).

La incertidumbre obtenida es inferior al 40% para un margen de seguridad  $k=2$ , por lo que el resultado es satisfactorio ya que se obtiene una incertidumbre total correcta (*véase apartado 7.3. Incertidumbre*).



Tal y como se explica en el apartado de resultados se han validado los extremos de la curva de calibrado y en la matriz con mayores dificultades (agua residual), de esta manera se contempla en la validación el resto de puntos intermedios y el resto de matrices.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos y que todas las dificultades encontradas han sido superadas con éxito, se puede concluir que el nuevo método analítico cumple con los objetivos, siendo un método muy válido para el empleo en análisis de contaminantes organoclorados.

 <p>Universitat d'Alacant Universidad de Alicante</p>	<p><i>Optimización y puesta a punto de métodos para la determinación de plaguicidas organoclorados mediante técnicas cromatográficas. Automatización de métodos.</i></p> <p><i>Trabajo Fin de Máster – Máster en Ingeniería Química</i></p>	 <p>LABAQUA</p>
--	---	--



## Bibliografía

- [1] I. A. Shiklomanov y J. C. Rodda (2004): “World Water Resources at Beginning of the Twenty-First Century”, Cambridge University Press, UNESCO 2003.
- [2] S. Uhlenbrook y M. Miletto (2016): “The United Nations World Water Development Report 2016 - Water and Jobs”, Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura
- [3] CAS. Chemical Abstract Service. [www.cas.org](http://www.cas.org). Último acceso enero 2016
- [4] L. Damià y M. José López de Alda (2008): “Contaminación y calidad química del agua: el problema de los contaminantes emergentes”, Instituto de Investigaciones Químicas y Ambientales-CSIC (Barcelona)
- [5] A. Franek, E. Koncagul, R. Connor y D. Hunziker (2015): “Agua para un mundo sostenible, datos y cifras”, Informe de las Naciones Unidas sobre los recursos hídricos en el mundo 2015
- [6] Ley 29/1985, de 2 de agosto, de Aguas.
- [7] Directiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 23 de Octubre de 2000 por la que se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas.
- [8] Decisión N° 2455/2001/CE del parlamento europeo y del consejo de 20 de noviembre de 2001 por la que se aprueba la lista de sustancias prioritarias en el ámbito de la política de aguas, y por la que se modifica la Directiva 2000/60/CE
- [9] Directiva 2008/105/CE del parlamento europeo y del consejo de 16 de diciembre de 2008 relativa a las normas de calidad ambiental en el ámbito de la política de aguas, por la que se modifican y derogan ulteriormente las Directivas 82/176/CEE, 83/513/CEE, 84/156/CEE, 84/491/CEE y 86/280/CEE del Consejo, y por la que se modifica la Directiva 2000/60/CE
- [10] Directiva 2013/39/UE del parlamento europeo y del consejo de 12 de agosto de 2013 por la que se modifican las Directivas 2000/60/CE y 2008/105/CE en cuanto a las sustancias prioritarias en el ámbito de la política de aguas
- [11] L Damià Barceló y M. José López de Alda (2007): “Contaminación y calidad química del agua: el problema de los contaminantes emergentes”.Panel Científico- Técnico de seguimiento de la política de aguas. Instituto de Investigaciones Químicas y Ambientales-CSIC. Barcelona



 <p>Universitat d'Alacant Universidad de Alicante</p>	<p><i>Optimización y puesta a punto de métodos para la determinación de plaguicidas organoclorados mediante técnicas cromatográficas. Automatización de métodos.</i></p> <p><i>Trabajo Fin de Máster – Máster en Ingeniería Química</i></p>	 <p>LABAQUA</p>
--	---	--

- [12] C. G. Daughton (2004): “Non-regulated water contaminants: emerging research” Environmental Chemistry Branch, Environmental Sciences Division, National Exposure Research Laboratory, U.S. EPA, 944 East Harmon Avenue, Las Vegas, NV 89119, USA
- [13] D. W. Kolpin, E. T. Furlong, M.T. Meyer, E. M. Thurman, S. D. Zaugg, L. B. Barber and H. T. Buxton (2000): “Pharmaceuticals, Hormones, and Other Organic Wastewater Contaminants in U.S. Streams” Environmental Science and Technology
- [14] N. Watanabe, B. A. Bergamaschi, K. A. Loftin, M. T. Meyer and T. harter (2010): “Use and Environmental Occurrence of Antibiotics in Freestall Dairy Farms with Manured Forage Fields”, Environmental Science and Technology
- [15] C. J. Sinclair and A. B. A. Boxall (2003): “Assessing the Ecotoxicity of Pesticide Transformation Products” Environmental Science and Technology
- [16] D.J. Lapworth, D.C. Gooddy (2006): “Source and persistence of pesticides in a semi-confined chalk aquifer of southeast England.” Environmental Pollution
- [17] M. J. Gil, A. M. Soto, J. I. Usma y O. D. Gutiérrez (2012): “Contaminantes emergentes en aguas, efectos y posibles tratamientos”, artículo de revisión.
- [18] Código Internacional de Conducta para la Distribución y Utilización de Plaguicidas de la Food and Agriculture Organization (FAO) (2006). Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación, Roma.
- [19] Clasificación toxicología de los plaguicidas según sus riesgos desarrollada por la OMS, (2009), Anexo B.
- [20] S. Briggs y R. Carson (1992): “Basic guide to pesticides. Their characteristics and hazards”. Washington: Taylor & Francis publishers.
- [21] Organización Mundial de la Salud (OMS) (1992): “Consecuencias Sanitarias del Empleo de Plaguicidas en la Agricultura”. Ginebra, Suiza.
- [22] Murty, A.S. (1986): “Toxicity of Pesticides to Fish”. Vol.I. CRC Press, inc. Florida, U.S.A
- [23] H. Bouwman, H. van den Berg and H. Kylin (2011): “DDT and Malaria Prevention: Addressing the Paradox”, Journal of Environmental Health Perspectives, Linköping University.





 <p>Universitat d'Alacant Universidad de Alicante</p>	<p><i>Optimización y puesta a punto de métodos para la determinación de plaguicidas organoclorados mediante técnicas cromatográficas. Automatización de métodos.</i></p> <p><i>Trabajo Fin de Máster – Máster en Ingeniería Química</i></p>	 <p>LABAQUA</p>
--	---	--

- [24] Reglamento (CE) N° 689/2008 del Parlamento Europeo y del consejo de 17 de junio de 2008 relativo a la exportación e importación de productos químicos peligrosos
- [25] Michael J. Kennish, (1996): "Practical Handbook of Estuarine and Marine Pollution". Institute of Marine and Coastal Sciences Rutgers University.
- [26] L. G. Calva y M. Torres (1998): "Plaguicidas organoclorados", Lab. De Ecosistemas Costeros. Departamento de Hidrobiología. D.C.B.S. UAM-I.
- [27] R. Lal y D. M. Saxena (1982): "Accumulation, metabolism, and effects of organochlorine insecticides on microorganisms". Microbiological Reviews. American Society for Microbiology (ASM).
- [28] Goldberg, D.E. (1976): "The Health of the Oceans". UNESCO Press, París, Francia.
- [29] B. J. Le Boeuf (2002): "Organochloride pesticides in California sea lions revisited". Department of Biology and Institute of Marine Sciences, University of California, Santa Cruz, USA.
- [30] A. Borrell, G. Cantos, A. Aguilar, E. Androukaki, P. Dendrinis (2007): "Concentrations and patterns of organochlorine pesticides and PCBs in Mediterranean monk seals (*Monachus monachus*) from Western Sahara and Greece" Department of Animal Biology, University of Barcelona, Spain
- [31] O. Espelanda, L. Kleivane S. Haugen J. Utne Skaareab (1997): "Organochlorines in Mother and Pup Pairs in Two Arctic Seal Species: Harp Seal (*Phoca groenlandica*) and Hooded Seal (*Cystophora cristata*)" Norwegian College of Veterinary Medicine, Department of Pharmacology, Microbiology and Food Hygiene, Division of Pharmacology and Toxicology, Oslo, Norway
- [32] PRONAME, (2008): "Distribución en biota de hidrocarburos poliaromáticos y plaguicidas organoclorados" Facultad de Ciencias, Instituto de Ciencias del mar y Limnología, Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático de México
- [33] P.W. Glynn, D.G. Rumbold, S.C. Snedaker (1995): "Organochlorine pesticide residues in marine sediment and biota from the northern Florida reef tract" Marine Pollution Bulletin.
- [34] Vanden Berghe M., Weijs L., Habran S., Das K, Bugli C., Rees J.F., Pomeroy P., Covaci A., Debier C. (2012): "Selective transfer of persistent organic pollutants and their metabolites in grey seals during lactation" Institut des sciences de la vie, Université catholique de Louvain; Toxicological Centre,



 <p>Universitat d'Alacant Universidad de Alicante</p>	<p><i>Optimización y puesta a punto de métodos para la determinación de plaguicidas organoclorados mediante técnicas cromatográficas. Automatización de métodos.</i></p> <hr/> <p><i>Trabajo Fin de Máster – Máster en Ingeniería Química</i></p>	 <p>LABAQUA</p>
--	---	--

University of Antwerp, Ecophysiology; Biochemistry & Toxicology, University of Antwerp; Laboratoire d'Océanologie, Université de Liège y el Institut de statistique, Université catholique de Louvain, Belgium. Sea Mammal Research Unit, University of St Andrews, Scotland, United Kingdom

- [35] V. Castro-Castro, Y. Siu-Rodas, L. V. González-Huerta, M. Y. Sokolov (2004): “efecto tóxico de DDT y endosulfan en postlarvas de camarón blanco, (*Litopenaeus vannamei*)” Laboratorio de Ecología Microbiana Aplicada, Departamento de Biotecnología Ambiental, El Colegio de la Frontera Sur, Unidad Tapachula, México
- [36] S. Espina, C. Vanegas. (1996): “Ecotoxicología y Contaminación”. Golfo de México Contaminación e Impacto Ambiental, Universidad Autónoma de Campeche.
- [37] M. Paul (1993): “Occupational and environmental reproductive hazards: a guide for clinicians”. Baltimore.
- [38] Fait A. Colosio C. (1998): “Recent advances and current concepts in pesticide hazards”. The year book of occupational and environmental medicine.
- [39] I. A. Al-Saleh (1994): “Pesticides: a review article” J Environ Pathol Toxicol Oncol.
- [40] Hill R. H. (1995): “Pesticide residues in urine of adults living in the United States: reference range concentrations” Division of environmental Health Laboratory Sciences, National Center for Environmental Health, Centers for Disease Control and Prevention, Georgia.
- [41] Naqvi, S., C. Vaishnavi (1993): “Bioaccumulative potential and toxicity of endosulfan an insecticide to non-target animals” Comparative Biochemistry and Physiology
- [42] A. C. Goore, D. Crews, L. L. Doan, M. La Merrill, H. Patisaul and A. Zota (2014): “Introducción a las Sustancias Químicas que Perturban el Sistema Endocrino (EDCs). Guía para Organizaciones de Interés Público y para las responsables de formular políticas”. Endocrine Society. IPEN.
- [43] M. N. Bates, S. J. Buckland, D. J. Hannah, J. A. Taucher, T. Van Maanen (1990): “Organochlorine Residues in the New Zealand Women”. Chemistry Division, Department of Scientific and Industrial Research, New Zealand. y Environment Health Sciences, University of California USA

 <p>Universitat d'Alacant Universidad de Alicante</p>	<p><i>Optimización y puesta a punto de métodos para la determinación de plaguicidas organoclorados mediante técnicas cromatográficas. Automatización de métodos.</i></p> <p><i>Trabajo Fin de Máster – Máster en Ingeniería Química</i></p>	 <p>LABAQUA</p>
--	---	--

- [44] I. Al-Saleh, N. Shinwari, P. Basile, I. el-Doush, M. al-Zahrani, M. al-Shanshoury, G. el-Din Mohammed (2003): “DDT and Its Metabolites in Breast Milk From Two Regions in Saudi Arabia”. Biological and Medical Research Department, Saudi Arabia
- [45] Rodas-Ortíz J. P., Ceja-Moreno V., González-Navarrete R. L., Alvarado-Mejía J., Rodríguez-Hernández M. E., Gold-Bouchot G. (2007): “Organochlorine Pesticides and Polychlorinated Biphenyls Levels in Human Milk from Chelem, Yucatán, México” Bull Environ Contam Toxicol, México.
- [46] Dr. M. A. Alawi, T. M. al Antary, H. Estaiyah, S. Al-Aqqad and N. Haddad (2016): “Chlorinated Pesticide Residues in human Breast Milk from Southern Jordan: Comparative Study Between 2008 and 2012” Faculty of Sciences, Department of Chemistry, University of Jordan, and Faculty of Agriculture, Department of Plant Protection.
- [47] Lilia albert (1981): “Residuos de plaguicidas Organoclorados en Leche Materna y Riesgo para la Salud”. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud de la OPS, Centro de Investigación, Instituto Politécnico Nacional, México.
- [48] Shaw G. M., Wasserman C. R., O'Malley C. D., Nelson V., Jackson R. J. (1999): “Maternal Pesticide Exposure from Multiple Sources and Selected Congenital Anomalies” Washington state department of Health, Olympia, California Department of Health Services, Berkeley.
- [49] E. A. Guillette, M. M. Meza, M. G. Aguilar, A. D. Soto, and I. E. Garcia (1998): “An Anthropological Approach to the Evaluation of Preschool Children Exposed to Pesticides in Mexico”, Environmental Health Perspectives
- [50] Hayes WJ, Lawes ER. (1991): “Chlorinated hydrocarbons insecticides. Pesticides studied in Man”. San Diego: Academic Press.
- [51] PubChem, Open Chemistry Database. Última entrada el 14/02/2017.
- [52] FAO/OMS, 2001: Pesticide residues in food – 2000. Evaluations – 2000. Part II – Toxicology. Ginebra (Suiza), Organización Mundial de la Salud, Reunión Conjunta FAO/OMS sobre Residuos de Plaguicidas
- [53] Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades. Última entrada el 14/02/2017.
- [54] F. W. Karasek, R. E. Clement. (1988): “Basic gas chromatography-mass spectrometry” Elsevier, Amsterdam.

 Universitat d'Alacant Universidad de Alicante	<p><i>Optimización y puesta a punto de métodos para la determinación de plaguicidas organoclorados mediante técnicas cromatográficas. Automatización de métodos.</i></p> <hr/> <p><i>Trabajo Fin de Máster – Máster en Ingeniería Química</i></p>	 LABAQUA
---	---	--

- [55] W. L. Budde. (2001) “Analytical mass spectrometry. Strategies for environmental and related applications”. American Chemical Society, Washington, D.C.
- [56] Elena E. Stashenko, Jairo René Martínez (2010): “GC-MS: Más de un Analizador de Masas, ¿para qué?” Universidad Industrial de Santander, Escuela de Química Centro de Investigación de Excelencia, CENIVAM, Laboratorio de Cromatografía. Bucaramanga, Colombia.